



Identification de nouvelles cibles pro-apoptotiques dans les leucémies aiguës myéloblastiques

Marion Piedfer

► To cite this version:

Marion Piedfer. Identification de nouvelles cibles pro-apoptotiques dans les leucémies aiguës myéloblastiques. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. <NNT : 2012PA05P624>. <tel-00781221>

HAL Id: tel-00781221

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00781221>

Submitted on 25 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES-PARIS V

**École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et
Environnement (MTCE)**

THÈSE

Présentée et Soutenue publiquement par

Marion PIEDFER

Le 12 novembre 2012

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : pharmacologie

**« Identification de nouvelles cibles pro-apoptotiques
dans les leucémies aiguës myéloblastiques »**

Membres du jury

Pr.Christiane GARBAY

Dr.Christian BAILLY

Dr. Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILÈS

Pr. Catherine LACOMBE

Dr. Christel GUILLOUF

Dr. Brigitte BAUVOIS

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

GLOSSAIRE

5

PARTIE 1 - INTRODUCTION

11

I. LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES

12

A. Caractéristiques cliniques	12
1. Epidémiologie	12
a) Incidence et mortalité	12
b) Populations concernées	13
2. Etiologie	13
a) Facteurs de risques : les toxiques	14
(1) Exposition chimique	14
(2) Radiation	14
(3) Chimiothérapies	15
b) Facteurs de risques: prédisposition	16
(1) Age	16
(2) Maladies génétiques	16
(3) Les maladies préleucémiques	17
3. La classification des sous-types de LAM	17
a) Classification FAB	17
b) Classification par l'OMS	19
4. Symptômes	21
5. Diagnostic	21
6. Traitements conventionnels	23
a) Patients jeunes (moins de 60 ans)	23
(1) Phase d'induction	23
(2) Phase de consolidation	23
b) Les patients âgés (plus de 60 ans)	24
B. Caractéristiques biologiques	24
1. La leucémogenèse	25
a) La cellule souche leucémique	25
(1) Caractéristiques	25
(2) La niche tumorale	27
b) Les aberrations génétiques	28
(1) Les mutations de type 1	29
(2) Les mutation de type 2	30
(a) Aberrations chromosomiques	30
(b) Mutations ponctuelles	32
(3) Les mutations non classées	33
(4) L'expression des miARNs	36
2. Les voies de signalisation dérégulées dans les LAM	36
a) Les voies d'apoptose	36
(1) La voie d'apoptose intrinsèque : la voie mitochondriale	37
(a) Famille Bcl-2	37
(i) Les membres anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-xl, bcl-w, Mcl-1, A1	37
(ii) Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	38
(a) Les BH3-only	38
(b) Les protéines multidomaines : Bax et Bak	39
(iii) Les interactions de la famille Bcl-2 et la perméabilisation mitochondriale	40
(a) Interactions anti-apoptotiques et pro-apoptotiques	40
(b) La perméabilisation mitochondriale	42
(2) La voie d'apoptose extrinsèque	44
(a) Les récepteurs de mort	45
(i) Caractéristiques	45
(a) Les récepteurs qui recrutent directement FADD	45
(b) Les récepteurs nécessitant le recrutement de TRADD puis de FADD	46
(ii) La dualité de ces récepteurs	46

(a)	Dualité survie-Mort	46
(b)	Dualité extrinsèque-intrinsèque	47
(b)	Les récepteurs à dépendance	47
(3)	Les caspases et leurs substrats	48
(4)	Dérégulation de l'apoptose dans les LAM	51
(a)	Anomalies dans les effecteurs de la voie intrinsèque	51
(b)	Anomalies dans les effecteurs de la voie extrinsèque	52
(c)	Anomalies dans l'activation des caspases	52
b)	Les voies de survie	53
(1)	La voie PI3K/AKT	53
(a)	Biologie générale de la voie PI3K/AKT	53
(i)	Activation et régulation	53
(ii)	Implication dans la survie et l'inhibition de l'apoptose	54
(iii)	Implication dans la croissance : la	55
voie PI3K/Akt/mTOR		55
(iv)	Implication dans la prolifération	58
(b)	Dérégulations dans les LAM	58
(2)	RAS/ MAP kinases	61
(a)	Biologie générale de la voie RAS/MAP Kinases	61
(b)	Dérégulations dans les LAM	62
(3)	JAK/STAT	62
(a)	Biologie générale de la voie JAK/STAT	62
(b)	Dérégulations dans les LAM	63
(4)	NF-κB	64
(a)	Biologie générale de la voie NF-κB	64
(b)	Dérégulations dans les LAM	65

II. LES TRAITEMENTS INNOVANTS : LES THERAPIES CIBLEES 69

1.	Cibler les antigènes de surface : les anticorps monoclonaux	69
a)	Anticorps monoclonal en essai clinique : Les Anti-CD33	70
(1)	Gemtuzumab-ozogamicin	70
(2)	Lintuzumab	71
b)	Les anticorps monoclonaux en évaluation préclinique	72
(a)	CD44	72
(b)	CD123	72
(c)	CD47	73
2.	Cibler les anomalies génétiques : les modulateurs épigénétique	74
a)	Les traitements hypométhylants	74
b)	Les inhibiteurs d'histones déacétylases	76
3.	Cibler les voies dérégulées dans les LAM	79
a)	Les voies d'apoptose	79
(1)	Les oligonucléotides antisens	79
(a)	Oblimersen (Genasense®) cible Bcl-2	79
(b)	AEG35156 Cible XIAP	80
(2)	Les BH3-mimétiques	81
(a)	ABT-737	81
(b)	GX15-070 ou obatoclax	82
b)	Les voies de survie : cibler les voies des récepteurs à tyrosine kinase	83
(1)	Cibler les récepteurs	83
(a)	Anti-FLT3	83
(i)	Les inhibiteurs de tyrosine kinase	83
(ii)	Les anticorps monoclonaux	88
(b)	Anti-Kit	88
(2)	Inhibitions des voies en aval	89
(a)	PI3K/Akt/mTOR	89
(i)	Inhibiteurs Akt	89
(a)	Pérfosine	89
(b)	MK2206	89
(c)	GSK2110183	89
(ii)	Inhibiteurs mTOR	89
(a)	Rapamycine et analogues	89

(b) Nouvelle génération	91
(b) Inhibiteurs des voies RAS/MAPK	92
(i) Anti-RAS	92
(ii) Anti-MEK	93
4. Les inhibiteurs du protéasome	93
a) Le bortezomib (PS-341)	94
b) Carfilzomib	98
c) Salinosporamide A	99
5. Les modulateurs MDR	99
a) Valspodar	99
b) Zosuquidar	100
III. L'APPORT DES COMPOSES NATURELS	100
 <u>PARTIE 2 - RESULTATS</u>	120
 ARTICLE 1 : L'AMINOPEPTIDASE-N/CD13 EST UNE CIBLE PRO-APOPTIQUE POTENTIELLE DANS LES CELLULES TUMORALES MYELOÏDES	121
I. Introduction	122
II. Résultats	124
III. Conclusions	125
 ARTICLE 2 : UN NOUVEL INHIBITEUR DU PROTEASOME CIBLE LA KINASE P70S6 ET INDUIT L'APOPTOSE DANS LES LEUCEMIES AIGUËS MYELOBLASTIQUES	127
I. Introduction	128
II. Résultats	129
III. Conclusions	131
 <u>PARTIE 3 - DISCUSSION</u>	134
 <u>ANNEXE</u>	138
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	140

GLOSSAIRE

A

ADCC : *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*
ADN : *Acide DésoxyriboNucléique*
AML1 : *Acute Myeloid Leukemia 1 protein*
APAF-1 : *Apoptotic Protease Activating Factor-1*
APL : *Acute Promyelocytic Leukemia*
AREB : *Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos*
AREB-t : *Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos en transformation*
ARF : *ADP ribosylation factor*
ASXL1 : *Additional Sex Comb-Like 1*
ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATRA : *Acide Tout Trans Retinoïque*

B

BAALC : *Brain And Acute Leukemia Cytoplasmatic*
Bad : *Bcl-2 Associated Death promoter*
BAFF : *B-cell-Activating Factor*
Bak : *Bcl-2 homologous antagonist/Killer*
Bax : *Bcl-2 associated X protein*
Bcl-2 : *B Cell Lymphoma 2*
BH : *Bcl-2 Homology domain*
Bid : *BH3-Interacting-domain Death agonist*
Bik : *Bcl-2 Interacting Killer*
Bim : *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
BIR : *Baculovirus IAP Repeat*
Bmi-1 : *B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*

C

CAD : *Caspase-activated DNase*
cAMP : *cyclic AMP*
CARD : *Caspase Recruitment Domain*
CBF : *Core Binding Factor*
CBL : *Casitas B-cell Lymphoma*
CDC : *Complement Dependent Cytotoxicity*
CDK : *Cyclin Dependent Kinase*
CDXX : *Cluster of Differentiation*
CEBP α : *CAAT/Enhancer Binding Protein*
c-FLIP : *cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory*
CREB : *cAMP Response Element-Binding protein*
CSH : *Cellule Souche Hématopoïétique*
CXCR4 : *C-X-C chemokine Receptor type 4 protein*

D

DAPK : *Death-Associated Protein Kinase*
DCC : *Deleted in Colorectal Carcinoma*
DD : *Death Domain*

DED : *Death Effector Domain*
DEPTOR : *DEP-domain-containing mTOR interacting protein*
Dnmt : *DNA methyltransferase*
DR4 : *Death Receptor 4*
DR5 : *Death Receptor 5*
Drp1 : *Dynamin-related protein 1*

E

4E-BP 1 : *Eukaryotic initiation factor 4E (eIF)-Binding Protein 1*
eIF (4A, 4B, 4E, 4G) : *eukaryotic Initiation Factor*
Elk-1 : *E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*
ERG : *Ets-Related Gene*
ERK : *Extracellular signal Regulated Kinase*
ETO : *Eigth Twenty One*
EV11 : *Ecotropic Viral integration 1*

F

FAB : *Franco-Américano-Britannique*
FADD : *Fas Associated Death Domain*
FasL : *Fas ligand*
FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*
FLAM : *FLavopiridol, cytarabine (Ara-C) et Mitoxanthrone*
FLT3 : *Fms-Like Tyrosine kinase 3*
FLT3-ITD : *FLT3-Internal Tandem Duplication*
FLT3-TKD : *FLT3-Tyrosine Kinase Domain*
FOXO : *FOrkhead boX protein O*

G

G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*
GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*
Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein*
GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase-3 β*
GTP : *Guanosine TriPhosphate*

H

HDAC : *Histone DeACetylase*
HOX : *HomeobOX*
Hsp90 β : *Heat shock protein 90*

I

IAP : *Inhibitor of APoptosis*
IC50 : *half maximal Inhibitory Concentration (Concentration Inhibitrice 50%)*
ICAD : *Inhibitor of CAD (Caspase-activated DNase)*
IDH1/IDH2 : *Isocitrate DésHydrogénase*
IGF-1 : *Insulin like Growth Factor 1*
IGF-1R : *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*
IKK : *I κ B Kinase*
IL-3, IL-6 : *InterLeukine-3, InterLeukine-6*
IRS 1 : *Insulin Receptor Substrate*

J

JAK 2 : *Janus Kinase 2*

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*

K

kDa : kiloDalton

K-RAS : *Kirsten RAS viral oncogene homolog*

L

LAM : Leucémies Aiguës Myéloblastiques

LDL : *Low-Density Lipoprotein*

LMMC : Leucémies MyéloMonocytaires Chroniques

LRP : *LDL-Related Protein*

M

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

Mcl-1: *induced Myeloid leukaemia cell differentiation protein*

Mdm2 : *Murine double minute 2*

MDR : *MultiDrug Resistance*

MLL : *Mixed Lineage Leukemia*

mLST8 : *mTOR associated protein, LST8 (lethal with Sec13 protein 8) homolog*

MN1 : *MeNingioma1*

MOMP : *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*

MPO : *Myéloperoxydase*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

MYH11 : *Myosin heavY cHain*

N

NEMO : *NF- κ B Essential MOdulator*

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B* (Facteur nucléaire kappa B)

NGF : *Nerve Growth Factor*

NIK : *NF- κ B-Inducing Kinase*

NMP : *Néoplasmes MyéloProlifératifs*

NOD/SCID : *NonObese Diabetic/Severe Combined Immune-Deficient*

NPM1 : *Nucléophosmine*

N-RAS : *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

NSE : *Non-Specific Esterase*

O

Omi/HtrA2 : *Omi/High temperature requirement protein A2*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

P

PARP : *Poly (ADP Ribose) Polymérase*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDCD4 : *Programmed Cell Death protein 4*

PDGFR β : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*

PDK1 : *Phosphoinositide-Dependant protein Kinase 1*

PgP : glycoprotéine P
 PI3K : *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*
 PIM-2: *Provirus Integration site for Moloney murine leukaemia virus*
 PIP2 : PhosphatidylInositol (4,5)-bisPhosphate
 PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
 PLC γ : PhosphoLipase C- γ
 PML : *ProMyelocytic Leukaemia* (leucémie promyélocytaire)
 PRAS40 : *Proline-Rich Akt-Substrate-40*
 PTD : *Partial Tandem Duplications*
 PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten*
 PTPN11 : *Protein Tyrosine standard Phosphatase Nonrecepteur 11*
 Puma : *p53 upregulated modulator of apoptosis*

R

Raptor : *Regulatory-associated protein of mTOR*
 RAR : Récepteur de l'Acide Rétinoïque
 RAS : *Rat Sarcoma*
 RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
 RE : Réticulum Endoplasmique
 Rheb : *Ras homologue enriched in brain*
 Rictor : *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*
 RIP1 : *Receptor-Interacting Protein*
 ROS : *Reactive Oxygen Species*
 rpS6: *ribosomal protein S6*
 RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*
 RXR : *Retinoid X Receptor*

S

SBB : *Sudan Black B*
 SCF : *Stem Cell Factor*
 SDF1 : *Stromal cell-Derived Factor-1 alpha*
 SH2 : *Src Homology domain*
 SHIP-1 : *SH2 domain containing inositol phosphatase-1*
 SHP-2 : *Src Homology Phosphatase 2*
 Siglec : *Sialic acid-binding Ig-related lectins*
 SIRP α : *Signal Regulatory Protein α*
 Smac/DIABLO : *Second mitochondria derivated activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low pl*
 SMD : Syndrome MyéloDysplasique
 SMMHC : *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain*
 SOS : *Son-of Sevenless*
 STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T

TAB2 : *TAK1-Binding protein 2*
 TAK1 : *Transforming growth factor β -Activated Kinase 1*
 TNF : *Tumor Necrosis Factor*
 TNF-R1 : *TNF Receptor*
 TOP : *Terminal OligoPyrimidine tract*

TRAIL : *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*
TRAMP : *TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*
TrkA : *TRK1-transforming tyrosine kinase protein*

U

5'UTR : *5' UnTranslated Region*
UNC5A-D : *UNCoordinated 5 homologs*

V

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

W

Wnt : *Wingless*
WT1 : *Wilm's tumor 1*

X

XIAP : *X-linked Inhibitor of APoptosis*

Nota : Toutes les références NCTXXXXXXXX sont disponibles sur le site clinicaltrials.gov

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une prolifération incontrôlée de précurseurs myéloïdes bloqués à divers stades de différenciation. Le traitement de cette pathologie reste difficile à cause des résistances et des rechutes aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels. Des thérapies ciblées sont en cours de développement basées sur les connaissances de la biologie des LAM.

Les produits d'origine naturelle font l'objet actuellement d'un regain d'intérêt pour le développement de thérapies anticancéreuses et lors de ma thèse, je me suis intéressée à des dérivés l'acide flavone-8-acétique pour le développement de thérapies ciblées :

- Une étude comparative des effets de la flavone acide 2',3'-dinitroflavone-8-acétique (DNFAA), inhibiteur connu de l'aminopeptidase APN/CD13 surexprimée dans les LAM et d'anticorps monoclonaux dirigés contre CD13 dans les LAM.
- Une étude portant sur la flavone 3,3'-Diamino-4'-methoxyflavone (nommée DD1) et ses effets dans les LAM.

Dans une première partie introductive, je présenterai les caractéristiques cliniques et biologiques des LAM puis les nouveaux axes de recherche pour le développement de thérapies ciblées. Dans une seconde partie, je présenterai mes travaux de thèse sur le ciblage de l'antigène CD13 et sur les effets de DD1 dans les LAM.

Mes travaux ont donné lieu à trois publications originales et deux communications dans des congrès internationaux :

Publications :

« Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells » Piedfer M, Dauzonne D, Tang R, N'Guyen J, Billard C, Bauvois B, FASEB J. 2011 Aug;25(8):2831-42.

« Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving bad and Noxa activation in human myeloid tumor cells » Merhi F, Tang R, Piedfer M, Mathieu J, Bombarda I, Zaher M, Kolb JP, Billard C, Bauvois B. PLoS One. 2011; 6(10)

« p70S6 kinase is a target of the novel proteasome inhibitor 3,3'-diamino-4'-methoxyflavone during apoptosis in human myeloid tumor cells » Piedfer M, Bouchet S, Tang R, Billard C, Dauzonne D, Bauvois B. *Soumis*

Posters :

ICACT 23rd International Congress on anti-cancer treatment

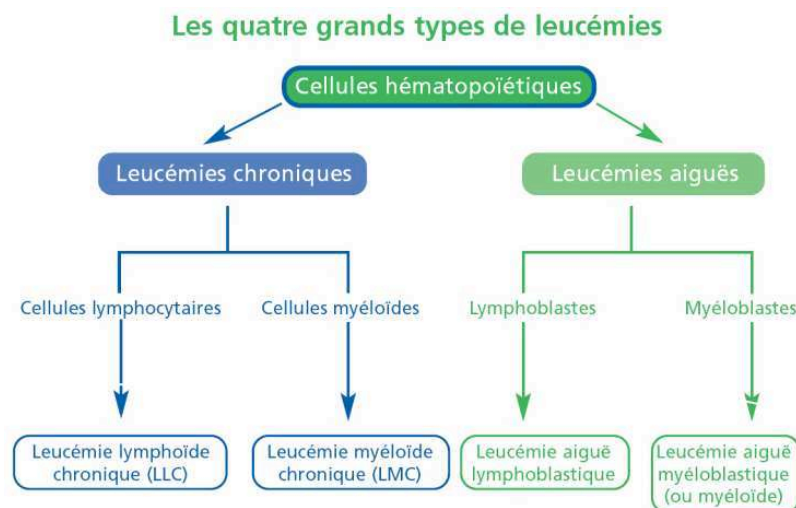
« A new flavone leads to apoptosis associated with p70S6 kinase and phospho-Bad downregulation in acute myeloid leukemia cells » Piedfer M, Bouchet S, Dauzonne D, Billard C et Bauvois B. Poster sélectionné par le jury de l'ICACT pour une courte communication orale en anglais

Cell Death in Cancer 1st International Congress

« Association between p70S6 kinase downregulation and mitochondrial dependent cell death in acute myeloid leukemia cells » Piedfer M, Bouchet S, Tang R, Dauzonne D, Billard C et Bauvois B

PARTIE 1 - INTRODUCTION

Les leucémies sont des hémopathies malignes caractérisées par l'accumulation et/ou la prolifération de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse et le sang ; il existe des leucémies chroniques et des leucémies aiguës. Les leucémies chroniques sont caractérisées par une évolution lente et par la prolifération et l'accumulation de cellules originaires de la moelle osseuse à un stade avancé de leur différenciation. Dans le cas où cette prolifération concerne des cellules lymphocytaires (cellules lymphoïdes de la lignée B) on parlera de leucémies lymphoïdes chroniques, s'il s'agit de cellules myéloïdes (lignée granulocytaire essentiellement) de leucémies myéloïdes chroniques. Les leucémies aiguës sont, elles, caractérisées par une évolution rapide et par la prolifération dans la moelle osseuse et dans le sang de cellules immatures. Suivant l'origine des blastes, lymphoblastes ou myéloblastes, on parle de leucémies aiguës lymphoblastiques ou de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Les leucémies doivent être distinguées des lymphomes qui sont aussi des tumeurs de cellules du sang mais se développant dans les aires lymphoïdes secondaires et des myélomes dont le foyer initial de la maladie est aussi la moelle osseuse mais dont le passage dans le sang est faible ou nul.



LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES

A. CARACTERISTIQUES CLINIQUES

1. EPIDEMIOLOGIE

a) INCIDENCE ET MORTALITE

Les leucémies aiguës sont des affections relativement rares. Les projections issues d'une modélisation statistique des données d'incidence observées dans les registres pour la période 1975-2008 ont permis à l'institut de veille sanitaire d'estimer à 3777 cas les leucémies aiguës en France en 2011, ces affections représentent 1 % des 25 cancers étudiés par l'Institut de Surveillance Sanitaire mais également 2,2% des décès par cancer. (Anon s. d.) L'incidence des leucémies aiguës augmente de façon régulière de 1980 à 2005 et cette progression semble être confirmée par les projections jusqu'en 2011 (figure 1). On peut émettre l'hypothèse que cette

augmentation d'incidence porte davantage sur les LAM, notamment secondaires, du fait du vieillissement de la population (voir paragraphe étiologie, p. 12). Des analyses ultérieures des différents sous-types permettront de confirmer cette hypothèse. La stagnation relative de la mortalité pourrait être la conséquence du plus grand nombre de décès survenant chez des sujets plus âgés. En effet, ces patients ont un pronostic moins favorable à cause de la forte prévalence de co-morbidités et le caractère plus souvent secondaire des leucémies et donc moins sensible aux thérapies.

Figure 1 : Pas d'autorisation de diffusion

Les LAM sont les formes les plus fréquentes des leucémies (25% des leucémies sont des LAM dans le monde occidental (Deschler & Lübbert 2006)). Les LAM constituent un groupe hétérogène de leucémies caractérisé par la prolifération clonale de précurseurs myéloïdes, appelés blastes leucémiques, plus ou moins engagés dans leur différenciation, devenus anormaux par l'accumulation de réarrangements chromosomiques et de mutations génétiques multiples. Ces cellules, bloquées dans leur différenciation, ne sont plus capables de répondre aux régulateurs de la prolifération et/ou de l'apoptose. Ces anomalies entraînent une altération de l'hématopoïèse normale, une accumulation dans la moelle osseuse, puis dans le sang de ces cellules anormales, et à terme une anémie, une neutropénie et une thrombocytopénie.

b) POPULATIONS CONCERNEES

L'incidence des LAM augmente avec l'âge (Anon s. d.) (figure 2). En effet, si l'on observe un pic de fréquence en dessous de 5 ans chez l'enfant, ce sont plutôt des pathologies de l'adulte, l'âge médian de survenue de la maladie étant de 65 ans.

Figure 2 : Pas d'autorisation de diffusion

Ce sont des affections mortelles dans un grand nombre de cas, notamment chez les sujets âgés difficiles à traiter avec les chimiothérapies conventionnelles (Deschler & Lübbert 2006). En effet, les conditions de co-morbidités chez les sujets âgés telles que des maladies cardiaques, des insuffisances rénales ou des maladies vasculaires impactent le métabolisme des agents thérapeutiques et empêchent l'administration de fortes doses de thérapies. De plus, les patients âgés sont plus susceptibles de développer une infection en cours de traitement. Enfin, les caractéristiques biologiques de ces LAM des personnes âgées ne sont pas les mêmes que celles des patients plus jeunes (voir paragraphe étiologie, âge p. 16) (Laubach & Rao 2008).

2. ETIOLOGIE

L'étiologie des LAM n'est pas connue, même si certains facteurs de risques ont été identifiés tels que l'exposition au benzène, aux radiations d'origine industrielle, militaire ou thérapeutique, aux solvants industriels et aux chimiothérapies cytotoxiques. Certaines maladies génétiques ont aussi été reconnues comme étant un facteur de risque concernant ces leucémies. Mais ces facteurs de risques sont responsables d'un petit nombre de cas.

a) FACTEURS DE RISQUES : LES TOXIQUES

(1) EXPOSITION CHIMIQUE

Le benzène a une action leucémogène connue depuis longtemps en raison de l'observation de l'augmentation de la fréquence des leucémies aiguës dans les cas d'exposition professionnelle chronique. En conséquence, son utilisation obéit à des règles strictes publiées dans le code du travail et une pathologie développée à son exposition peut être reconnue maladie professionnelle. L'exposition au benzène a été associée à l'apparition de nombreuses aberrations chromosomiques dans les lymphocytes du sang circulant des individus fortement exposés au benzène. Il est très probable que l'apparition de ces aberrations soit responsable de l'induction de LAM chez ces individus (McHale et al. 2012). Les actions leucémogènes du benzène sont dues à sa métabolisation par les cytochromes qui produit des molécules dangereuses pour l'organisme. En effet, ces métabolites du benzène sont capables d'induire des mutations dans l'ADN soit par leurs interactions directes avec l'ADN et la formation d'adduits, soit par leurs interactions indirectes via la modification de la topoisomérase II ou les mécanismes de réparation de l'ADN. Les métabolites du benzène pourraient aussi modifier la différenciation cellulaire par des changements de méthylation de certains gènes. Enfin l'augmentation du stress oxydatif qu'il induit peut entraîner une prolifération cellulaire (Meek & Klaunig 2010). Certains chercheurs ont alors suggéré que le tabagisme pourrait être un facteur de risque au vu de l'exposition au benzène qu'il entraîne. Des recherches ont été menées notamment une grande étude par E.V. Kane et ses collègues en 1999. Leurs conclusions étaient que les personnes qui fumaient régulièrement au cours de leur vie avaient plus de risques (1,2 à 2,3 fois) que les individus n'ayant jamais fumé de développer une leucémie aiguë (Kane et al. 1999).

(2) RADIATION

Le rôle des radiations ionisantes est également bien démontré notamment chez les survivants d'explosion atomique (D. A. Pierce et al. 1996). En effet, il a été observé que certaines aberrations chromosomiques, notamment sur les chromosomes 5 et 7, étaient beaucoup plus répandues chez les patients qui avaient survécu à Hiroshima ou Nagasaki que chez les patients nés avant 1945 (M. Nakanishi et al. 1999). Les individus exposés professionnellement aux radiations ionisantes peuvent aussi avoir un risque augmenté de leucémies mais les protocoles et les systèmes de protection utilisés de nos jours diminuent fortement ces risques et aujourd'hui il n'y a plus de corrélation entre l'incidence des cancers et le fait de travailler avec des radiations ionisantes (Yoshinaga et al. 2004).

Par ailleurs, les malades traités par radiothérapie ont un risque accru de LAM. Ces LAM induites par les traitements sont appelée LAM secondaires.

Les leucémies aiguës secondaires peuvent également être le résultat de complications tardives de traitements chimiothérapiques. Ces leucémies sont considérées comme étant une conséquence directe des événements mutationnels induits par la chimiothérapie mais les mécanismes rentrant en jeu ne sont pas encore bien définis (Godley & R. A. Larson 2008). Il existe deux types de LAM induites de façon secondaire par les chimiothérapies selon le type de traitement administré. Les caractéristiques cytogénétiques, morphologiques et le temps de développement après exposition de ces deux types sont différents.

–**Le premier type** concerne les patients traités par des agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide) ou ayant subi des séances de radiothérapie. Ces leucémies secondaires concernent des précurseurs hématopoïétiques précoces, sont souvent associées avec des aberrations des chromosomes 5 et /ou 7 (retrouvées aussi dans les LAM *de novo*, c'est-à-dire dans les leucémies non secondaires) et précédées dans un grand nombre de cas par une phase myélodysplasique préleucémique. Leur temps de latence est d'environ 5 à 7 ans et la médiane de survie 8 mois.

–**Le deuxième type** de LAM induite par les chimiothérapies est celui des leucémies dues à des expositions aux agents qui inhibent la topoisomérase II (étoposide, teniposide et les anthracyclines). Ces LAM ont un temps de latence plus court (2 à 3 années), sont généralement associées avec des anomalies du bras long du chromosome 11 (à la localisation du gène MLL, anomalie retrouvée aussi dans les LAM *de novo*) et ne sont généralement pas précédées d'un syndrome myélodysplasique. Le pronostic est plus sévère que les LAM *de novo* mais moins sévère que le premier type de leucémie secondaire.

Dans les deux cas, les anomalies retrouvées sont identiques à celles des LAM *de novo* mais la fréquence des anomalies défavorables est considérablement plus élevée dans les LAM secondaires, ce qui explique le taux inférieur de rétablissement dans ces cas.

Le fait que les anomalies retrouvées dans ces leucémies secondaires soient les mêmes que celles des LAM *de novo* et que le temps de latence soit relativement long laissent penser que la leucémogénèse est le résultat de plusieurs mutations sur des gènes codant pour un avantage prolifératif et/ou de survie et des gènes impliqués dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, comme c'est le cas dans les LAM *de novo* (Qian et al. 2010).

Par ailleurs, certains polymorphismes concernant les gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments, la protection contre le stress oxydant ou encore la réparation de l'ADN, ont été reliés à un risque plus élevé de développer une leucémie secondaire. L'étude de ces polymorphismes pourrait permettre de définir un facteur de risque pour les patients traités par des chimiothérapies de développer une leucémie secondaire (Godley & R. A. Larson 2008).

b) FACTEURS DE RISQUES: PREDISPOSITION

(1) AGE

La biologie des LAM montre une évolution des anomalies génétiques selon l'âge. En effet, comparés aux patients plus jeunes, les patients âgés ont une plus grande incidence d'anomalies caryotypiques aux pronostics sévères, plus fréquemment une phase myélodysplasique précédant le déclenchement de la LAM et une plus grande expression de protéines impliquées dans la résistance aux chimiothérapies (Laubach & Rao 2008).

Une des explications est qu'une partie des LAM des personnes âgées sont des LAM secondaires à des traitements chimiothérapeutiques mais dans les autres cas l'étiologie de ces LAM reste incomprise. Les anomalies retrouvées chez ces patients sont les mêmes que celles que l'on retrouve dans les cas de LAM secondaires dues à des agents génotoxiques, on peut donc penser que le développement de ces LAM est dû à l'accumulation d'exposition aux toxiques. Mais les rares études épidémiologiques sur la hauteur de la contribution de l'environnement dans l'étiologie des LAM montrent que les risques de développer la maladie sont incertains (sauf en cas d'expositions importantes) et n'expliquent pas l'incidence des LAM sur les personnes âgées. La potentialité que des dommages intrinsèques soient associés à des souches hématopoïétiques vieillissantes semble très réelle (Bowen 2006).

Caractéristiques des LAM des patients âgés :

- Faible indice fonctionnel
- Co-morbidité et dysfonction organique
- Facteurs liés aux spécificités des leucémies des personnes âgées :
 - ☐ Caryotype avec mutations non favorables
 - ☐ Mutations ponctuelles de gènes (FLT3-ITD...)
 - ☐ Antécédents de maladies dysplasiques
 - ☐ Leucémies secondaires aux traitements
 - ☐ Expression de MDR

Figure 3 : Caractéristiques spécifiques des LAM des personnes âgées. Adapté de « Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? » Harry P. Erba.

(2) MALADIES GENETIQUES

Certaines maladies génétiques sont associées à un risque élevé de développer une LAM chez l'enfant. C'est le cas de la trisomie 21, du syndrome de Bloom, l'anémie de Fanconi et de la neurofibromatose. Ces maladies sont caractérisées par des défauts dans la réparation de l'ADN, un nombre anormal de chromosomes ou encore des translocations chromosomiques (Belson et al. 2007). Ainsi, les enfants atteints de trisomie 21 ont un risque 10 à 20 fois plus élevé de développer une leucémie aiguë lymphoblastique ou une leucémie aiguë myéloblastique que des enfants non atteints. Environ la moitié des leucémies développées sont des leucémies aiguës mégacaryoblastiques (LAM M7 classification FAB) (Xavier et al. 2009). L'implication de cette trisomie dans le développement de ces leucémies

est double. Tout d'abord une région de ce chromosome code pour des oncogènes entraînant la prolifération des mégacaryocytes et d'autre part la trisomie entraîne la surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif et de l'uracile provoquant ainsi une incorporation dérégulée d'uracile dans l'ADN. Ceci entraîne des mutations telles que celle du gène GATA1, retrouvé muté uniquement dans les cas de leucémies aiguës mégacaryoblastiques associées à une trisomie 21 et codant pour un facteur de transcription responsable du développement des lignées érythroïde et mégacaryocytaire (Khan et al. 2011).

(3) LES MALADIES PRELEUCEMIQUES

Certaines hémopathies peuvent évoluer vers une leucémie aiguë myéloblastique. C'est le cas de syndromes myéloprolifératifs telles que la leucémie myéloïde chronique dont l'acutisation est l'évolution inéluctable en absence de traitement, et de la splénomégalie myéloïde, de la thrombocytémie essentielle ou la maladie de Vaquez qui peuvent également, bien que plus rarement, se transformer en LAM. Ces maladies sont caractérisées par une prolifération de cellules d'une ou plusieurs lignées myéloïdes (polynucléaires pour les leucémies myéloïdes chroniques, globules rouges pour la maladie de Vaquez, plaquettes pour la thrombocytémie essentielle et augmentation du volume de la rate avec implication préférentielle de la lignée mégacaryocytaire dans la splénomégalie myéloïde).

Les myélodysplasies telles que les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) ou les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) peuvent aussi se transformer en LAM. Ces syndromes sont caractérisés par des anomalies de la cellule souche hématopoïétique qui entraînent des dysplasies dans une ou plusieurs lignées myéloïdes. Les différences avec les LAM sont le taux de blastes dans la moelle osseuse (moins de 20%) et une apoptose accrue qui explique l'impossibilité des cellules à maturer (alors que dans la LAM il s'agit d'un blocage de la maturation qui entraîne une accumulation des cellules anormales). L'accumulation de nouvelles anomalies génétiques dans la cellule souche hématopoïétique et une subséquente augmentation de la survie cellulaire explique l'évolution vers une LAM (Corey et al. 2007).

L'acutisation de syndromes myéloprolifératifs chroniques ou des syndromes myélodysplasiques donnent des LAM de très mauvais pronostic.

3. LA CLASSIFICATION DES SOUS-TYPES DE LAM

a) CLASSIFICATION FAB

Les leucémies aiguës myéloblastiques constituent un groupe hétérogène d'affections hématologiques. Les différents types de LAM ont été historiquement décrits par la classification internationale FAB (Franco-Américano-Britannique) en 1976 (J M Bennett et al. 1976). Cette classification est basée sur l'aspect morphologique des cellules leucémiques et sur la présence ou non de certains antigènes à leur surface. Elle définit 7 types de LAM (de M0 à M6) puis en 1985 un type M7 est ajouté (Neame et al. 1986) (tableau 1).

Type FAB	Morphologie	Immunophénotype
M0 (indifférenciée)	Blastes indifférenciés, sans granules, se distingue de M1 et d'une leucémie aiguë lymphoblastique uniquement par immunophénotypage	CD13+ ou CD33+ ou MPO+
M1 (sans maturation)	Prédominance de myéloblastes avec moins de 10% de différenciation granulocytaire	MPO+ CD13/CD33/CD65 +/- CD14-
M2 (avec maturation granuleuse)	Plus de 30% de myéloblastes avec plus de 10% de différenciation granulocytaire, différenciation monocyttaire inférieure à 20%	MPO+ CD13/CD33/CD65 +/- CD14-
M3 (à promyélocytes)	a) Promyélocytes hypergranuleux avec de nombreux corps d'Auer b) Forme variante avec des noyaux multilobés et abondance de promyélocytes hypergranuleux	MPO+ CD13+/CD33+ Normalement CD34- et HLA-DR-
M4 (myélomonocytaire)	Cellules monocytaires avec entre 30% et 80% de monocytes différenciés Variante M4 éosinophile : présence d'éosinophiles immatures	Combinaison de marqueurs M1/M2 et M5
M5 (monocytaire)	Cellules monocytaires avec plus de 80% de monocytes différenciés a) Monoblastiques, faiblement différenciés b) monocyttaire, différenciés	CD13/CD33/CD65/CD14/CD64 +/- HLA-DR +/-
M6 (érythroleucémie)	Plus de 50% d'érythroblastes avec plus de 30% de myéloblastes qui ne sont pas des cellules érythroïdes	Erythroblastes GlyA+ et CD36+ Myéloblastes MPO/CD13/CD33/CD65 +/- CD14-
M7 (mégacaryoblastiques)	Très polymorphe, quelquefois des blastes vacuolés, quelques-uns avec des expansions cytoplasmiques, parfois aggrégés avec des plaquettes	CD13/CD33 +/- CD41+ ou CD61+

Marqueurs myéloïdes : CD13, CD33, CD65, CD14, MPO (Myéloperoxydase)

Marqueurs érythroïdes : GlyA, CD36

Marqueurs plaquettaires : CD41, CD61

HLA-DR : récepteur de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité

Tableau 1 : Classification FAB

Source : Atlas de poche d'hématologie Médecine-Sciences

b) CLASSIFICATION PAR L'OMS

En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a complété cette classification FAB en intégrant les données génétiques et cliniques. Les changements principaux concernent le seuil pour la définition de LAM, la création d'entités distinctes selon les anomalies génétiques retrouvées et la prise en compte des antécédents de traitement et/ou de l'existence d'une importante dysplasie.

En effet, la nouvelle classification définit une LAM dès que le taux de blastes est supérieur à 20% alors qu'auparavant une leucémie aiguë myéloblastique était définie par 30% de blastes. La raison de cette évolution est le pronostic similaire des patients avec plus de 30% de blastes et ceux avec 20% à 30% de blastes (diagnostiqués avant 2001 comme atteints de AREB-t (anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation)). De plus, pour certaines LAM associées aux anomalies t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22) et t(15;17)(q22;q12) le nombre de blastes dans le sang ou dans la moelle n'est plus pris en considération pour le diagnostic de LAM, ces anomalies suffisent à cette définition (Vardiman et al. 2002).

Pendant les années d'utilisation de la classification FAB, il a été observé que de nombreux cas de LAM étaient associés à des anomalies génétiques récurrentes qui affectent les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la maturation des cellules myéloïdes. De plus, l'étude de ces anomalies récurrentes a montré que celles-ci ont des valeurs pronostiques et que leur prise en compte pour la thérapie est très pertinente. La classification OMS a donc choisi d'intégrer ces anomalies et ainsi de prendre en compte la réalité clinique et thérapeutique qui en découle.

Par ailleurs, l'observation que les LAM avec antécédents de syndrome myélodysplasique (SMD) ou avec antécédents de traitements chimiothérapeutiques ont des caractéristiques particulières a entraîné la création de deux nouveaux types de LAM : les LAM avec myélodysplasie « multilignée » et les LAM ou SMD secondaires à des thérapies. Cette création repose sur l'importante dysplasie caractéristique de ce type de LAM, leur pronostic plus sévère que les LAM sans antécédent, et leur association fréquente à des anomalies génétiques particulières (3q,-7/del(7q),-5/del(5q),+8,12p,-,18,+19,del(20q) et des anomalies caryotypiques complexes).

L'OMS a donc défini 4 grands groupes de LAM : *les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, les LAM avec signes de dysplasie touchant plusieurs lignées, les LAM secondaires à des traitements chimiothérapeutiques et les LAM n'entrant pas dans les autres catégories* (Leymarie et al. 2004) (tableau 2). En effet, si l'évaluation idéale des patients se base sur les anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires, ces informations ne sont pas toujours disponibles ou identifiées. Dans ces cas, la classification cytomorphologique garde son importance et les critères de classement restent basés sur la classification FAB, exception faite de la catégorie M3 qui disparaît et rejoint le groupe des LAM avec anomalies génétiques récurrentes puisqu'il s'agit de LAM associée à une anomalie caryotypique spécifique t(15;17)(q22;q12).

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

LAM avec t(8;21)(q22;q22), AML1(CBF- α) / ETO

LAM avec t(15;17)(q22;q11-12), PML / RAR- α et variantes

LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), CBF-[1] / MYH11

LAM avec anomalies 11q23, MLL

LAM avec myélodysplasie « multilignée »

Avec antécédent de SMD

Sans antécédent de SMD

LAM et SMD « secondaires » à des thérapeutiques

Après agents alkylants ou exposition radiations ionisantes

Après inhibiteur de topoisomérase II

« Secondaires » autres

LAM n'entrant pas dans les catégories précédentes

LAM avec différenciation minimale (M0-FAB)

LAM sans maturation (M1-FAB)

LAM avec maturation (M2-FAB)

LAM avec différenciation myélomonocytaire (M4-FAB)

LAM monocytaire (M5-FAB)

LAM avec différenciation érythroblastique (M6-FAB)

LAM avec différenciation mégacaryocytaire (M7-FAB)

LAM avec différenciation basophile

LAM avec myélofibrose

Sarcome granulocytaire

LA biphénotypique

Tableau 2 : Classification de l'OMS

En 2008, l'OMS a révisé cette classification en ajoutant de nouveaux critères pour la définition de certains types de LAM et de nouvelles sous catégories notamment à partir de caractéristiques génétiques récemment découvertes (Vardiman et al. 2009).

Dans le type *LAM avec anomalies génétiques récurrentes*, aux 4 sous groupes précédemment définis, trois anomalies génétiques ont été ajoutées : LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; correspondant à la protéine de fusion DEK-NUP214, LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1 et LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1. Ces anomalies sont associées à des caractéristiques cliniques et morphologiques qui les identifient comme des entités à part entière.

Mais le challenge de la classification de 2008 est d'inclure des anomalies moléculaires telles que FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), NPM1 (Nucléophosmine) et CEBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) qui ont de fortes valeurs pronostiques mais qui ne définissent pas un groupe homogène avec des caractéristiques propres et qui se retrouvent très souvent associées à d'autres anomalies. Les LAM avec NPM1 ou CEBPA muté ont donc été ajoutées dans la classification comme entités provisoires. Pour ce qui est du FLT3 muté, celui-ci étant très souvent associé à d'autres anomalies, il n'a pas été possible de définir une entité en tant que telle mais à cause de sa forte valeur pronostique une détection de cette anomalie est fortement recommandée notamment dans les cas de caryotypes normaux.

Le type *LAM avec signes de dysplasie touchant plusieurs lignées* s'élargit en devenant *LAM associées à une myélodysplasie*. Les LAM associées à cette catégorie sont les LAM avec historique de SMD ou SMD/NMP (NMP : Néoplasmes MyéloProlifératifs), les LAM avec anomalies génétiques caractéristiques des myélodysplasies et enfin les LAM avec au moins 50% de cellules dysplasiques dans au moins deux lignées.

Le type *LAM/SMD « secondaires » à des traitements chimiothérapeutiques* n'est plus subdivisé selon le type de traitement incriminé, la plupart des patients recevant à la fois des agents alkylants et des inhibiteurs de topoisomérases. Ces LAM ne sont pas associées à des anomalies génétiques particulières mais le fait que les patients aient des pronostics significativement moins bons que les patients avec LAM *de novo* laissent penser que d'autres différences biologiques entrent en jeu, ainsi cette catégorie a été maintenue (Vardiman 2010).

Le type *LAM n'entrant pas dans les autres catégories* a lui aussi évolué. Les cas de leucémies avec différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire ont été reclassées dans la catégorie des *LAM associées à une myélodysplasie* et les cas de LAM mégacaryocytaires associées avec des anomalies génétiques particulières sont reclassés dans le type *LAM avec anomalies génétiques récurrentes*.

Enfin, deux nouveaux groupes ont été créés : *les syndromes prolifératifs dus au syndrome de Down* et *leucémies à cellules dentritiques blastiques plasmocytoïdes*.

4. SYMPTOMES

Les signes cliniques des LAM sont non spécifiques et pour la plupart attribuables à l'envahissement médullaire par les blastes leucémiques. En effet, les anomalies génétiques retrouvées dans ces blastes rendent leur maturation impossible et leur prolifération augmentée. Cette accumulation entraîne une inhibition de la différenciation des progéniteurs sains par un encombrement physique de l'espace médullaire et la production de nombreuses cytokines inhibitrices (Elihu Estey & H. Döhner 2006). Ceci se traduit par une insuffisance médullaire entraînant une anémie, une neutropénie et une thrombopénie avec comme conséquences cliniques une grande fatigue, des infections et des hémorragies.

D'autres symptômes peuvent être attribués à l'infiltration par les blastes du foie, de la rate, de la peau, des ganglions, des os, des gencives et du système nerveux central.

5. DIAGNOSTIC

Le diagnostic des LAM se base sur les caractéristiques des blastes leucémiques. Il nécessite un examen des frottis sanguins et médullaires avec une étude morphologique, cytochimique, cytogénétique et de biologie moléculaire. Chaque fois que possible, il faut conserver des blastes viables, de l'ADN et de l'ARN tumoral, ainsi que du sérum (tumorothèques).

-Morphologie et cytochimie : Les cellules du sang et de la moelle sont colorées avec un marquage au May-Grünwald-Giemsa et le déséquilibre des différentes lignées est constaté (au moins dans la moelle car dans certains cas très peu de blastes sont présents dans le sang). Pour un diagnostic de LAM, le compte des blastes sanguin ou de la moelle doit être supérieur ou égal à 20%, sauf pour certains types de LAM (voir paragraphe classification par l'OMS

p. 19). Les blastes sont caractérisés par une chromatine plus fine et plus granuleuse que les leucocytes normaux. Pour identifier la lignée impliquée, des tests cytochimiques sont souvent utilisés tel que des marquages myéloperoxydase (MPO) ou au noir soudan (SBB) et aux estérases non spécifiques (NSE). La détection de MPO indique une différenciation myéloïde mais son absence n'exclut pas une implication de la lignée myéloïde puisque les myéloblastes précoces et les monoblastes peuvent ne pas avoir de MPO. Le SBB a le même rôle que le MPO mais est moins spécifique. Le marquage NSE est diffus dans le cytoplasme des monoblastes (plus de 80% de marquage) et des monocytes (plus de 20% de marquage). Ces caractéristiques sont comparées à ceux de la classification FAB ce qui permet une première classification du type de LAM.

-Immunophénotypage : Cette technique est utilisée pour établir le diagnostic des LAM avec différenciation minimale, des LAM mégacaryocytaires et des leucémies aiguës avec ambiguïté de lignées. Les LAM avec différenciation minimale expriment dans la plupart des cas des antigènes associés à l'hématopoïèse précoce tels que CD34, CD38 et HLA-DR. Les LAM mégacaryocytaires expriment des glycoprotéines plaquettaires telles que CD41 et/ou CD61. Les leucémies aiguës avec ambiguïté de lignées ne montrent pas de différenciation dans une lignée ou expriment des marqueurs spécifiques de plusieurs lignées (H. Döhner et al. 2010).

-Cytogénétique : L'analyse cytogénétique est aujourd'hui une part entière du diagnostic des LAM. En effet, 55% des patients ont des anomalies caryotypiques et 7 translocations et inversions chromosomiques récurrentes sont classées dans la catégorie *LAM avec anomalies génétiques récurrentes* par la classification de l'OMS 2008. Cette caractérisation permet de déterminer les facteurs pronostiques des patients. Un minimum de 20 cellules en métaphase doit être analysé pour établir un diagnostic de LAM avec caryotype normal ou un caryotype avec une anomalie récurrente (H. Döhner et al. 2010).

-Biologie moléculaire : Les patients avec caryotypes normaux ont des anomalies au niveau des gènes et différentes techniques moléculaires peuvent être utilisées pour les détecter. L'hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) permet de détecter des arrangements géniques qui ne sont pas détectables par l'analyse caryotypique. Les techniques de PCR permettent de détecter les mutations ponctuelles retrouvées dans les LAM notamment NPM1 et CEBPA (entités provisoires dans la classification OMS 2008) et les mutations FLT3. Ces mutations ne sont pas répertoriées dans la classification de l'OMS mais leur détection est recommandée au vu de leur valeur pronostique (voir paragraphe aberrations génétiques, p 28).

Ces caractéristiques cliniques des LAM découlent des caractéristiques biologiques des clones leucémiques ; nous allons voir maintenant ces caractéristiques au niveau génétique et moléculaire avec l'étude plus précise des anomalies génétiques retrouvées dans les LAM et les voies de signalisation dérégulées associées.

6. TRAITEMENTS CONVENTIONNELS

Depuis 30 ans, le traitement des LAM a généralement consisté en une combinaison d'une anthracycline, telle que daunorubicine ou idarubicine et de la cytarabine. Cette thérapie se déroule en deux phases ; une première phase d'induction et une phase de consolidation. La phase d'induction a pour but d'atteindre une rémission complète définie par moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse avec un retour des fonctions normales de celle-ci. Il est maintenant connu que dans de nombreux cas cette phase d'induction seule ne suffit pas et que de nombreux patients rechutent. Ainsi, une phase de consolidation est ensuite amorcée, réduisant de 50% le risque de rechute. Aujourd'hui, on peut espérer guérir environ 40% des patients dans le cas de patients jeunes. Cela est dû à une meilleure compréhension et à une meilleure prise en charge des patients lors des phases de pancytopenie induites par les traitements. Malheureusement, les espoirs de guérison sont moindres chez les patients plus âgés (plus de 60 ans) : approximativement 40% à 65% atteignent la rémission complète mais 85% rechutent dans les 2 ou 3 ans (A. Burnett et al. 2011).

a) PATIENTS JEUNES (MOINS DE 60 ANS)

(1) PHASE D'INDUCTION

Le traitement d'induction consiste en 3 jours d'anthracycline (daunorubicine au moins 60mg/m² ou idarubicine, 10-12 mg/m² ou anthracenedione mitoxantrone, 10-12 mg/m²) et 7 jours de cytosine arabinoside (nommée également cytarabine ; en intraveineuse, 100-200 mg/m²) (H. Döhner et al. 2010). Cette combinaison est préconisée depuis plus de 40 ans et aucune autre thérapie n'a encore montré une efficacité supérieure au point de la détrôner. Des doses plus importantes de cytarabine peuvent être pratiquées avec un espoir de phases de rémission plus longues mais la survie globale n'étant pas modifiée, ces hautes doses ne sont pas recommandées formellement en induction.

Plusieurs études ont comparé la daunorubicine versus d'autres anthracyclines sans mettre en évidence un bénéfice particulier. De même, l'ajout d'un troisième agent cytotoxique ou modulateur de la pompe d'efflux (PgP : glycoprotéine P) n'a pas montré d'augmentation du taux de réponse (A. Burnett et al. 2011).

(2) PHASE DE CONSOLIDATION

Plusieurs types de stratégies peuvent être appliqués : plusieurs cycles de chimiothérapie intensive ou une thérapie à hautes doses suivie d'allogreffe ou d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

–Chimiothérapies intensives :

Il s'agit généralement de hautes doses de cytarabine. Le nombre de cycles de traitement, la dose appropriée, le calendrier d'administration ainsi que l'intérêt de combinaison entre plusieurs agents restent des questions en suspens.

–Grefe de cellules souches hématopoïétiques :

Plusieurs essais cliniques ont évalué le bénéfice d'une allogreffe de cellules souches et si cette stratégie a un meilleur effet anti-leucémique que la chimiothérapie, elle n'augmente pas la survie globale des patients. Ces greffes font partie des traitements standards depuis 25 ans mais leurs bénéfices en terme de survie restent en débat en raison de risque de réaction du greffon contre l'hôte. La décision se fait au cas par cas et porte sur le bénéfice-risque pour le patient au regard de l'agressivité de la chimiothérapie nécessaire à la greffe (elle entraîne une aplasie importante) et l'efficacité de cette greffe (A. Burnett et al. 2011).

Le choix de l'une ou de l'autre stratégie post-rémission se fait selon le facteur pronostic de la leucémie. Dans les cas de LAM avec pronostics favorables (LAM CBF, LAM avec mutation NPM1 sans FLT3 muté et les LAM avec mutations CEBPA) 3 cycles de cytarabine à haute dose ou plus sont bénéfiques pour les patients et la greffe n'est généralement pas envisagée lors de la première rémission. En effet, ces patients ont un risque de rechute moins important que les autres et ont aussi plus de probabilité de répondre une nouvelle fois si jamais ils rechutent. La greffe de moelle osseuse est donc généralement remise à la deuxième rechute. Au contraire, chez les patients avec un pronostic défavorable la transplantation est la meilleure option car ils ont plus de risques de ne pas répondre une deuxième fois si jamais ils venaient à rechuter. Pour les patients avec pronostics intermédiaires, cette décision se base sur l'âge du patient, du donneur et leurs compatibilités, les co-morbidités présentes chez le patient... qui permettent de définir un score de risque (A. Burnett et al. 2011).

b) LES PATIENTS AGES (PLUS DE 60 ANS)

Les patients âgés répondent moins bien aux traitements que les patients plus jeunes. Cela est dû à la fois à une faiblesse organique accrue et à la spécificité de la biologie des LAM qui les concernent (voir étiologie, âge p 16). De plus, une étude récente (Rao et al. 2009) a montré que certaines voies de signalisation : RAS, SRC et TNF sont particulièrement activées chez ces patients. Ces dérégulations contribuent au taux de survie peu élevé et à la résistance aux traitements.

Les médecins ne veulent souvent pas administrer de hautes doses de chimiothérapies à cause des toxicités que les patients âgés peuvent ne pas supporter. Toutefois, une étude (B Löwenberg et al. 1989) comparant la chimiothérapie intensive à des traitements palliatifs laisse penser que le bénéfice de traitements à hautes doses est réel, tout du moins chez certains groupes de patients (Erba 2010). Une étude suédoise plus récente semble valider cette hypothèse (Juliussen et al. 2009).

B. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

Le cancer est un processus évoluant par étape avec l'acquisition de mutations dans une cellule somatique, la sélection d'un clone puis la prolifération à partir de ce clone. L'acquisition de nouvelles mutations lors de cette prolifération peut apporter de nouveaux avantages et le

nouveau clone ayant acquis ces nouvelles mutations, est sélectionné à son tour. La longue période nécessaire la plupart du temps au développement d'un cancer et les multiples mutations retrouvées dans les cellules cancéreuses laissent penser que cette sélection se fait au cours du temps selon les contraintes de l'environnement tumoral et que plusieurs clones peuvent être en compétition au sein des tumeurs. Les clones sélectionnés ont des mutations qui leur apportent un avantage sélectif par rapport aux autres cellules mais aussi des mutations « passagères » qui n'ont pas de rôle dans le développement du cancer mais qui seront gardées puisqu'elles sont dans les clones sélectionnés. L'identification de mutations que l'on retrouve de façon récurrente dans les cellules cancéreuses des patients permet de déterminer quelles sont les mutations « conductrices » impliquées dans la cancérisation dans la diversité importante des mutations « passagères » (Mel Greaves & Maley 2012).

D'autre part, la notion de cellule souche cancéreuse responsable du maintien de la maladie est suggérée dans la plupart des cancers. Cette notion est née de l'observation de l'hétérogénéité des tumeurs avec certaines cellules capables d'auto-renouvellement *in vitro* et capables de redonner naissance à une tumeur *in vivo* (T Reya et al. 2001). Ces observations ont été faites au départ dans les leucémies par l'équipe de J.E. Dick.

1. LA LEUCEMOGENESE

a) LA CELLULE SOUCHE LEUCEMIQUE

(1) CARACTERISTIQUES

Les travaux de D. Bonnet et J.E. Dick en 1997 (Bonnet & J E Dick 1997) ont montré que les cellules leucémiques dans les LAM sont organisées en hiérarchie à partir d'une cellule souche leucémique CD34⁺ CD38⁻ et ainsi se développent de façon similaire à l'hématopoïèse normale. Ces cellules souches leucémiques ont tous les caractères des cellules souches normales : elles sont peu nombreuses, capables d'auto-renouvellement infini, sont quiescentes la plupart du temps et transmettent leurs caractéristiques, notamment leur caractère malin, lorsqu'elles sont implantées dans des souris immunodéficientes. Ces cellules sont également moins sensibles aux traitements et il a donc été suggéré qu'elles sont responsables du maintien de la tumeur et notamment des rechutes après traitement. Le développement de ces capacités se fait soit par acquisition de caractéristiques tumorales dans une cellule souche hématopoïétique normale soit par l'acquisition des caractéristiques de cellule souche (auto-renouvellement...) dans une cellule entrée dans un processus de cancérisation (Buss & Ho 2011). En effet, les cellules souches normales semblent être une bonne cible pour le processus de cancérisation puisqu'elles ont des capacités d'auto-renouvellement, de prolifération infinie et un temps de vie relativement long. Plusieurs mutations sont nécessaires pour la transformation maligne et ces cellules qui sont maintenues pendant de longues périodes ont donc le temps nécessaire pour l'acquisition de telles mutations (D Gary Gilliland et al. 2004). Néanmoins des expériences montrent que des progéniteurs plus avancés dans la différenciation peuvent retrouver leurs caractéristiques de cellules souches leucémiques lorsqu'ils sont transformés par les gènes de fusion MLL-ELL ou MLL-GAS7. D'autres transformations sont capables de redonner la capacité d'auto-

renouvellement aux cellules souches hématopoïétiques mais pas aux progéniteurs plus engagés. Cela laisse penser que les progéniteurs peuvent être transformés en cellules souches leucémiques mais que ce n'est peut-être pas la transformation la plus fréquente et qu'elle est le résultat de mutations particulières. Ces observations suggèrent que le plus souvent cette transformation intervient dans des cellules souches hématopoïétiques (Misaghian et al. 2009). Mais on peut également penser que les mutations requises pour la transformation dans les deux cas ne sont pas les mêmes considérant que les caractéristiques des cellules au départ ne sont pas les mêmes. Les cellules souches possédant la capacité de s'auto-renouveler, les mutations concernant ces voies ne sont pas nécessaires et les mutations entraînant la cancérisation concernent des voies impliquées dans la survie et la différenciation. Au contraire, si une cellule progénitrice est à l'origine de la tumeur, les mutations acquises lui redonneront la capacité de s'auto-renouveler (D Gary Gilliland et al. 2004). Dans certains types de leucémies, la cellule originaire est bien identifiée notamment dans les leucémies myéloïdes chroniques où la cellule souche hématopoïétique semble être la cible première des mutations (C. Zhao et al. 2007).

Dans les deux cas, l'hétérogénéité des tumeurs est expliquée, les cellules souches vont se diviser de façon asymétrique en donnant une cellule identique et une cellule un peu plus différenciée et ainsi de suite jusqu'à une cellule qui n'est plus capable d'auto-renouvellement. Il va donc exister une hétérogénéité dans les degrés de différenciation de cellules et ces cellules vont diverger au fur et à mesure des multiplications du clone souche de départ et ainsi toutes les cellules formant la tumeur n'auront pas des caractéristiques identiques concernant les mutations acquises, l'expression de marqueurs cellulaires... Ceci explique ainsi le caractère très hétérogène des tumeurs (K. Anderson et al. 2011).

Les cellules souches leucémiques ont donc des mutations dans les voies de signalisation impliquées dans le développement des cellules souches normales, ces dérégulations sont responsables de l'acquisition des capacités d'auto-renouvellement (T Reya et al. 2001). Plusieurs études utilisant des techniques de pointe en matière de séquençage ont caractérisé ces dérégulations. Les voies Bmi-1 (*B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*), Wnt (*Wingless*), Sonic Hedgehog, Notch et NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*), nécessaires au développement des cellules souches normales, ont été ainsi impliquées dans le développement des cellules souches leucémiques (Yoriko Saito et al. 2010)(Ravindra Majeti, Becker, et al. 2009).

- **Le groupe de protéines Bmi-1** est requis pour l'auto-renouvellement des cellules souches à travers leur perte de fonction et sa surexpression entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Van Etten 2007).

- **La voie de signalisation Wnt** joue un rôle critique dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et sa dérégulation est impliquée dans les cellules souches leucémiques (C. Zhao et al. 2007). Wnt induit une voie cellulaire via sa liaison à son récepteur composé d'une protéine à 7 domaines transmembranaires (Frizzled) et d'une protéine de la famille des récepteurs aux LDL : LRP (*Low-Density Lipoprotein (LDL)-Related Protein*). Cela entraîne la stabilisation de la β -caténine qui a normalement une demi-vie très courte et

son adressage au noyau. Son association avec d'autres protéines entraîne la transcription de gènes impliqués dans la prolifération tels que c-Myc et cyclin D1. Il a été démontré que la surexpression de la β -caténine mutante dans les cellules souches hématopoïétiques induit leur expansion et empêche leur différenciation tandis que l'expression de l'antagoniste de la β -caténine empêche la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Tannishtha Reya et al. 2003).

- **La voie Sonic Hedgehog** dont la suractivation est impliquée dans la cancérisation d'une grande variété de tissus (Takebe et al. 2011) est requise pour la maintenance des cellules souches normales et leucémiques (C. Zhao et al. 2009).

- **L'expression du ligand de Notch**, Jagged-1, dans les cellules entraîne la libération du domaine intracellulaire de Notch, sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes impliqués dans l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (Takebe et al. 2011).

- **La voie NF- κ B** est activée de façon constitutive dans les cellules souches leucémiques et a un rôle dans leur survie (à la différence des cellules souches normales) (M L Guzman et al. 2001).

Ces modifications dans les voies de signalisation peuvent expliquer en partie la résistance de ces cellules souches leucémiques aux traitements chimiothérapeutiques par rapport aux autres cellules leucémiques. Une autre propriété entraîne une résistance de ces cellules : elles sont quiescentes la plupart du temps, cela les rend insensibles aux nombreux traitements ciblant le cycle cellulaire.

La résistance de ces cellules souches peut aussi s'expliquer par des facteurs extrinsèques produits par le microenvironnement tumoral que l'on appelle la niche tumorale.

(2) LA NICHE TUMORALE

Les cellules souches résident dans des zones particulières de la moelle osseuse : les niches ostéoblastique et vasculaire. Le maintien du nombre de cellules et le développement des cellules hématopoïétiques sont finement régulés par les cellules stromales de la moelle osseuse à travers la production de cytokines, de chimiokines et de signaux intracellulaires via des adhérences cellule-cellule. La croissance des cellules leucémiques modifie l'hématopoïèse normale des cellules progénitrices par la création d'un microenvironnement tumoral en détournant les signalisations normales qui maintiennent habituellement les cellules souches hématopoïétiques dans les niches (Colmone et al. 2008). L'adhérence des cellules souches hématopoïétiques au microenvironnement de la moelle osseuse se fait par des interactions entre CXCL12 (SDF1 : *stromal cell-derived factor-1 alpha*) et son récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*). Or les taux de CXCR4 sont élevés de façon significative dans les cellules leucémiques des patients LAM permettant le maintien des cellules souches leucémiques dans la moelle osseuse (Möhle et al. 2000). De même, les intégrines sont

nécessaires pour l'interaction des cellules souches leucémiques dans la niche et sont cruciales pour le maintien d'une maladie résiduelle. En effet, l'interaction avec les intégrines entraîne l'activation de la voie de survie PI3K/Akt. L'antigène CD44 joue aussi un rôle très important dans le maintien des cellules souches leucémiques dans un stade primitif ; il entraîne l'activation de nombreuses voies de transduction (M. Y. Konopleva & Craig T Jordan 2011).

Les capacités d'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques sont une caractéristique que partagent tous les types de leucémies mais en plus des mutations requises, un nombre important de translocations chromosomiques et de mutations ponctuelles dans les cellules myéloïdes qui entraînent des avantages prolifératifs, de survie et d'inhibition de la différenciation (D Gary Gilliland et al. 2004).

b) LES ABERRATIONS GENETIQUES

Les LAM comme d'autres cancers sont la conséquence de plusieurs mutations (mutations ponctuelles, réarrangements de gènes et/ou translocations chromosomiques). Ce mécanisme a été démontré grâce à des modèles animaux. Par exemple, l'expression de PML-RAR α (associée avec la translocation t(15 ;17) dans les leucémies aiguës promyélocyaires) dans des souris transgéniques montre la nécessité d'un long temps de latence avant de développer une leucémie et une pénétrance incomplète (environ 15-30%). Cela indique la nécessité d'apparition d'une autre mutation pour le développement d'une leucémie (L. Z. He et al. 1997).

De même, les travaux de Greaves et son équipe ont démontré que certaines translocations telles que t(4 ;11) (associées à la fusion MLL-AF4) ou t(12 ;21) (associées à la fusion ETV6-RUNX1 appelé aussi TEL-AML1) sont présentes lors du développement utérin mais n'entraînent une leucémie que plus tardivement au cours de la vie, démontrant à nouveau la nécessité d'apparition d'une nouvelle mutation (Ford et al. 1998). Gilliland et ses collègues ont proposé en 2001 (Dash & D G Gilliland 2001) que le mécanisme de leucémogénèse se fasse en plusieurs étapes par l'accumulation de mutations de type 1, apportant un avantage prolifératif, et de type 2, bloquant le processus de différenciation des cellules myéloïdes. Les deux types de mutations forment des groupes de complémentation et il est rare de trouver deux mutations du même groupe dans une LAM (cas particulier pour AML1 (RUNX1) et MLL qui appartiennent au même groupe de complémentation mais dont la co-occurrence est observée). Certaines mutations récemment identifiées ne sont pas encore classées dans l'un ou l'autre des groupes puisque leurs conséquences ne sont pas encore bien identifiées.

Par ailleurs, 55% des patients ont des anomalies au niveau chromosomique et 45% ont un caryotype normal mais une très grande variabilité de mutations au niveau génomique. L'identification de ces anomalies est importante pour la compréhension de la physiopathologie, l'identification de facteurs pronostiques et le développement de traitements plus ciblés (Fröhling et al. 2005).

Les mutations de type 1 sont des mutations apportant des avantages prolifératifs et/ou de survie aux progéniteurs hématopoïétiques en dérégulant certaines voies de signalisation telles que celles impliquant N-RAS et K-RAS, FLT3 et c-Kit.

- **N-RAS et K-RAS** (*neuroblastoma- et Kirsten- Rat Sarcoma Viral Oncogene*) : Les voies de signalisation impliquant RAS sont activées par une large gamme de cytokines et jouent un rôle important dans la prolifération et la survie de progéniteurs hématopoïétiques en activant la voie des MAP kinases. Des mutations activatrices de RAS sont retrouvées dans différents types de tumeurs et dans 15% à 25% des LAM. Ces mutations ne sont pas associées à des anomalies caryotypiques particulières, ni aux caractéristiques cliniques ou au pronostic de la leucémie (X. Thomas & Elhamri 2005a).

- **FLT3** (*FMS-like tyrosine kinase 3*) : Le gène FLT3 code pour un récepteur de type tyrosine kinase exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques normaux de la moelle osseuse et notamment des CSH (cellules souches hématopoïétique). Son ligand est exprimé et sécrété par les cellules du microenvironnement de la moelle osseuse entraînant son activation et ainsi la stimulation de la croissance et la survie des cellules progénitrices dans la moelle et dans le sang. FLT3 est exprimé de façon importante dans les LAM (entre 70% et 100% des LAM de tous types de FAB) et cette surexpression joue un rôle dans la survie et la prolifération des blastes leucémiques. De plus, il existe deux types de mutations activatrices de ce récepteur retrouvés dans les LAM : des duplications internes en tandem d'une séquence palindromique présente dans la région juxta-membranaire du récepteur (FLT3-ITD), et des mutations ponctuelles au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase (FLT3-TKD) (D Gary Gilliland & Griffin 2002). La mutation du gène FLT3 est l'altération la plus fréquente dans les LAM.

- **FLT3-ITD** (*FLT3-internal tandem duplication*): Mutations retrouvées entre 25 et 30 % des cas, les duplications retrouvées sont très variables, mais toujours dans le cadre de lecture et entraînent une perte de fonction du domaine inhibiteur. Ces mutations sont associées à un mauvais pronostic (S. Scholl et al. 2009).

- **FLT3-TKD** (*FLT3-tyrosine kinase domain*) : Mutations ponctuelles retrouvées chez 7% des patients qui entraînent une conformation active de la boucle et donc une meilleure fixation de l'ATP et du substrat. La relation entre ces mutations et l'incidence au niveau du pronostic reste encore en débat (S. Scholl et al. 2009).

Les deux types de mutations conduisent à la dimérisation, à l'activation et l'autophosphorylation du récepteur de façon constitutive. Cette altération se traduit par une activation des voies PI3K/AKT, PLC γ , STAT5 et les voies Ras/Erk impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires (Mrózek et al. 2007).

- **C-Kit** : Le gène Kit code pour un récepteur de type tyrosine kinase qui a pour ligand le *Stem Cell Factor* (SCF). Des mutations activatrices dans le domaine extracellulaire ou la

boucle d'activation sont retrouvées dans 20% à 30% des patients ayant des aberrations chromosomiques spécifiques telles que t(8;21) et inv(16). Ces mutations entraînent une hyperactivation des voies MAPK et PI3K en aval du récepteur.

- **CBL** : Le gène *CBL (Casitas B-cell Lymphoma)* code pour une ubiquitine ligase qui cible une grande variété de tyrosine kinases et entraîne leur dégradation. Les mutations de ce gène entraînent l'inhibition de l'internalisation et l'ubiquitination de FLT3 et ainsi augmente l'amplitude et la durée du signal de ce récepteur (Sargin et al. 2007).

- **PTPN11** : Le gène de *PTPN11 (Protein Tyrosine standard Phosphatase Nonrecepteur 11)* code pour une phosphatase cytoplasmique appelée SHP-2 (*Src Homology Phosphatase 2*). Cette phosphatase, très exprimée dans les cellules hématopoïétiques, participe à la transduction du signal en aval des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones et des molécules d'adhérence en partie via la voie RAS/MAPK. Les mutations entraînent une anomalie dans la transition forme active/forme inactive de la phosphatase mais leurs rôles dans la pathogénicité des LAM reste à déterminer. Elles ne semblent pas avoir de valeur pronostique mais cela doit être plus clairement établi (S. Takahashi 2011a).

- **JAK2** (*Janus Kinase 2*) : Il s'agit d'une tyrosine kinase cytoplasmique impliquée dans la transduction de signaux initiés par plusieurs récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines, requis pour l'hématopoïèse. Les mutations de ce récepteur entraînent une augmentation de son activité kinase et l'activation de voies en aval telles que STAT5, PI3K/AKT, ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*). La mutation JAK2V617F est retrouvée chez 70% des patients ayant une LAM précédée d'une maladie myéloproliférative mais est rare dans les LAM *de novo* (A Renneville et al. 2008).

Ces mutations seules entraînent une maladie ressemblant à une leucémie myéloïde chronique caractérisée par une prolifération accrue de globules blancs mais ces cellules sont matures et fonctionnelles. L'apparition de mutations de type II en plus de ces mutations de type 1 entraîne une LAM. Les mutations de type 2 concernent les capacités de différenciation et d'apoptose et entraînent une maladie de type syndrome myélodysplasique en absence de mutation de type 1 (Kelly & D Gary Gilliland 2002).

(2) LES MUTATION DE TYPE 2

(a) ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

De nombreuses translocations chromosomiques sont retrouvées dans les LAM ; elles conduisent à la formation de protéines chimériques impliquées dans la pathologie. Certaines anomalies chromosomiques ont été identifiées comme entités à part entière, au vu de leurs caractéristiques cliniques et biologiques spécifiques, dans le sous groupe *LAM avec anomalies génétiques récurrentes* dans le classement de l'OMS en 2008.

Les plus fréquentes sont les suivantes :

- **Translocation concernant CBF** : CBF (*Core Binding Factor*) est un facteur de transcription avec deux sous-unités, CBF α (appelé aussi AML1 ou encore RUNX1) et CBF β . RUNX1 interagit directement avec l'ADN et CBF β interagit avec RUNX1 et permet l'activation de la transcription.

CBF régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique tels que les gènes codant pour IL-3, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) et des gènes importants pour la maturation des lymphocytes T et B. (Dash & D G Gilliland 2001) CBF est critique pour l'hématopoïèse normale et est la cible de plusieurs remaniements dans les LAM, deux sous-groupes sont caractérisés dans le classement OMS 2008 : RUNX1/ETO et CBF β /MYH11. Ces translocations concernent 10% à 15% des leucémies (K. Döhner & H. Döhner 2008) et sont de bon pronostic (S. Scholl et al. 2009).

- RUNX1/ETO (nommé aussi AML1/ETO, AML1 : *acute myeloid leukemia 1 protein*) : Correspond à la translocation t(8 ;21). RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*) est un des gènes les plus fréquemment dérégulés dans les LAM à la fois par des remaniements chromosomiques mais aussi par des mutations ponctuelles ou des amplifications (A Renneville et al. 2008). ETO (*eight-twenty one oncogene*) est un répresseur de la transcription. Ainsi la protéine chimérique RUNX1/ETO recrute des co-répresseurs et inhibe l'expression des gènes normalement régulés par RUNX1 (J D Licht 2001).

- CBF β /MYH11 (nommé aussi CBF β /SMMHC, SMMHC : *Smooth muscle myosin heavy chain et MYH11 : Myosin heavy chain*) : Correspond à la translocation chromosomique inv(16)/t(16 ;16) qui fusionne les 165 premiers acides aminés de CBF β avec la région C-terminale de la chaîne lourde de la myosine musculaire. La protéine chimérique interagit avec RUNX1 et inhibe la transcription des gènes cibles de ce dernier en recrutant des co-répresseurs (Martens & Stunnenberg 2010).

Ces CBF/AML sont fréquemment associées à des mutations dans les gènes KIT (1/3 des CBF/AML), NRAS, KRAS et FLT3 (Goyama & Mulloy 2011).

- **PML/RAR α** : Correspond à la translocation t(15,17) caractéristique des leucémies aiguës promyélocyaires (ou APL (*Acute Promyelocytic Leukemia*), sous-type M3 dans la classification FAB de 1985). Cette translocation donne une protéine chimérique entre RAR α (*Retinoic Acid Receptor alpha*) un récepteur nucléaire aux hormones et PML (*ProMyelocytic Leukemia*) une protéine nucléaire avec doigt de zinc. En absence de l'acide rétinoïque (ATRA), RAR α interagit avec RXR (*Retinoid X Receptor*), lie ses gènes cibles impliqués dans la différenciation, l'apoptose et l'auto-renouvellement et inhibe leur expression en recrutant des corépresseurs. Cette inhibition est renversée par la présence d'ATRA qui induit un changement de conformation et entraîne la dissociation des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs. La protéine chimérique PML/RAR α est insensible à la présence d'ATRA dans les concentrations physiologiques ; elle recrute de façon anormale des co-répresseurs de la transcription et agit ainsi continuellement en répresseur. Des doses

pharmacologiques d'ATRA sont utilisées pour le traitement des patients présentant cette translocation (Martens & Stunnenberg 2010).

- **MLL** (*Mixed Lineage Leukemia*, 11q23) : Le gène MLL code pour un facteur de transcription de 431 kDa qui présente de nombreux modules : trois domaines de fixation et de courbure de l'ADN, un domaine d'homologie aux méthyltransférases et plusieurs domaines d'activation ou de répression de la transcription. Il est exprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques notamment dans les CSH et impliqué dans l'activation de plusieurs promoteurs notamment ceux régulant l'expression des gènes HOX (*Homeobox*). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui participent au développement de multiples tissus et notamment du système hématopoïétique. MLL est une des plus fréquentes cibles dans les leucémies aussi bien dans les LAM que dans les leucémies aiguës lymphoblastiques et les leucémies biphénotypiques. En effet, il existe plus de 50 translocations affectant ce gène et ces translocations sont retrouvées dans environ 10% des LAM (Krivtsov & Armstrong 2007). La plupart des protéines chimériques résultant de ces translocations n'ont pas d'homologies et leur fonction est inconnue. Un peu plus de données sont disponibles pour les 5 translocations les plus fréquentes qui sont t(4;11)(q21;q23) : MLL-AF4; t(9;11)(p22;q23) : MLL-AF9; t(11;19)(q23;p13.3) : MLL-ENL; t(10;11)(p12;q23) : MLL-AF10; et t(6;11)(q27;q23) : MLL-AF6. Tous les produits de ces translocations sont capables de fixer certains partenaires de la machinerie de l'ARN polymérase II et ainsi activer la traduction de plusieurs centaines de gènes. L'implication de cette activation de la transcription dans la pathologie reste peu claire (Marschalek 2010). Néanmoins, l'expression de la protéine de fusion MLL-1/AF9 entraîne une leucémie aiguë myéloblastique chez des souris confirmant les propriétés oncogéniques de cette protéine chimérique (Corral et al. 1996). Au plan clinique, le pronostic de ces réarrangements est très sévère (Marschalek 2010).

(b) MUTATIONS PONCTUELLES

- **RUNX1 (AML1)** : Ce gène code pour une des sous-unités de CBF, il est requis pour l'hématopoïèse et pour la différenciation des progéniteurs myéloïdes en granulocytes. Les mutations de ce gène retrouvées dans les LAM sont des mutations non-sens et faux-sens et pourraient impliquer un pronostic moins favorable chez ces patients que chez ceux qui ne portent pas ces mutations (H. Döhner & Gaidzik 2011).

- **CEBP α** (*CCAAT/Enhancer Binding Protein α*) : Le gène CEBP α code pour un facteur de transcription qui joue un rôle crucial pendant la différenciation de nombreux types cellulaires notamment les cellules hématopoïétiques. CEBP α agit par de multiples façons : il régule négativement l'expression de c-Myc autorisant la différenciation, il régule positivement l'expression de gènes spécifiques de la lignée granulocytaire et enfin il agit en synergie avec d'autres gènes impliqués dans le développement myéloïde (A Renneville et al. 2008). Les souris qui n'ont pas le gène CEBP α sont incapables de développer des granulocytes matures alors que les autres lignées ne sont pas atteintes (D. E. Zhang et al. 1997). Il a été montré que la perte de fonction de CEBP α facilite la leucémogénèse en

bloquant la différenciation granulocytaire (Pabst et al. 2001). De plus, l'étude d'un modèle de souris mimant les anomalies de CEBP α retrouvées chez les patients semble impliquer cette protéine dans le contrôle de l'auto-renouvellement et l'engagement dans une lignée hématopoïétique dans les CSH (Reckzeh & Cammenga 2010). Plusieurs mécanismes d'inactivation de CEBP α ont été décrits chez les patients atteints de LAM : la régulation négative de son expression à cause de la fusion RUNX1/ETO et l'apparition de mutations ponctuelles entraînant sa perte de fonction. Différentes mutations sont observées et si certaines semblent conférer un bon pronostic d'autres sont moins favorables (H. Döhner & Gaidzik 2011).

- **MLL** (*Mixed Lineage Leukemia*) : 5% à 11% des patients avec caryotypes normaux ont des mutations dans le gène MLL et notamment des duplications partielles en tandem (nommée MLL-PTD avec PTD : *Partial Tandem Duplications*). Ces duplications préservent les fonctions de MLL et contribuent à la leucémogénèse par hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs (Marcucci et al. 2011).

(3) LES MUTATIONS NON CLASSEES

La liste des gènes probablement impliqués dans les LAM s'étoffe de plus en plus grâce à de nouvelles technologies telles que le criblage de gènes haut débit. Voici quelques uns de ces nouveaux gènes candidats.

- **Dnmt** (*DNA Methyltransferases*) : Des mutations de ce gène ont été identifiées par séquençage haut débit d'ADN de patients atteints de LAM et retrouvées chez 22% d'entre eux (Ley et al. 2010). Les Dnmt sont des enzymes qui catalysent l'addition d'un groupement méthyle sur les cytosines des îlots CpG. Les mutations Dnmt n'altèrent pas de façon très importante la méthylation globale de l'ADN mais la méthylation de certains gènes, tels que les gènes HOX, sont affectés. Ces mutations sont associées avec les mutations FLT3, NPM1 et IDH et confèrent un mauvais pronostic (H. Döhner & Gaidzik 2011).

- **TET2** (*Tet oncogene family member 2*) : Ce gène a été récemment identifié comme un gène candidat en tant que suppresseur de tumeur dans les syndromes myélodysplasiques, myéloprolifératifs et dans les LAM grâce à un séquençage haut débit d'ADN de cellules de patients (Delhommeau et al. 2009). Dans cette étude, des mutations de ce gène ont été retrouvées chez 27% des patients atteints de LAM. Les protéines TET sont impliquées dans la régulation épigénétique. Elles sont capables de convertir des méthylcytosines en hydroxyméthylcytosines, formes intermédiaires de déméthylation des cytosines, et ainsi ont un rôle dans la déméthylation de l'ADN. Les mutations de TET2 dans les LAM entraînent un taux moindre d'hydroxyméthylcytosine ainsi ce gène pourrait être associé à la leucémogénèse en participant à l'hyperméthylation souvent observée dans les cancers. Ces mutations sont mutuellement exclusives avec les mutations IDH1/IDH2 et leur implication pronostique n'est pas encore claire (H. Döhner & Gaidzik 2011).

- **IDH1/IDH2** (*Isocitrate DesHydrogenase*) : Ce gène a été identifié par séquençage du génome entier de patients atteints de LAM (Mardis et al. 2009). Ce criblage a révélé des mutations déjà identifiées telles que NRAS ou NPM1 mais aussi des mutations IDH1 qui n'avaient jamais été observées. De plus, les IDH sont une nouvelle classe de protéines mutées dans la leucémogénèse puisqu'il s'agit d'enzymes métaboliques (Marcucci et al. 2011). Ces protéines catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate avec formation de NAD(P)H. Elles sont impliquées dans le métabolisme cellulaire au niveau de la synthèse lipidique, la protection contre le stress oxydant et la transduction du signal médié par l'oxygène. Les patients ayant des mutations dans ces gènes ont des hyperméthylations aberrantes de leur génome, cela s'explique par une production d'un métabolite anormal : 2-hydroxyglutarate qui inhibe la déméthylation amorcée par TET2. Les mutations IDH et TET2 sont d'ailleurs mutuellement exclusives (S. Takahashi 2011a). Deux études (Nicolas Boissel et al. 2010)(Paschka et al. 2010) ont analysé la fréquence et la valeur pronostique de ces mutations. Ces études montrent qu'elles touchent entre 11% et 16% des patients, qu'elles sont associées très souvent avec un caryotype normal et avec des mutations NPM1 et MLL et enfin qu'elles sont corrélées à un haut risque de rechute et une survie moindre.

- **NPM1** (Nucléophosmine) : La nucléophosmine est une phosphoprotéine ubiquitaire qui transite entre le noyau et le cytoplasme avec une localisation nucléaire prédominante. Des mutations de ce gène sont retrouvées chez 46% à 62% des patients LAM avec un caryotype normal (Mrózek & Bloomfield 2006) et 25% à 35% de toutes les LAM (H. Döhner & Gaidzik 2011). Ces mutations entraînent l'apparition d'une séquence d'export vers le cytoplasme et entraîne une localisation cytoplasmique aberrante (Falini et al. 2005). Toutes les mutations de ce gène entraînent une altération de sa distribution cellulaire laissant penser que celle-ci a un rôle dans la leucémogénèse et qu'elle interfère probablement avec les fonctions de la nucléophosmine (Falini et al. 2011). Cette dernière joue un rôle de protéine chaperonne dans le noyau permettant d'établir de multiples interactions protéine-protéine. Elle a un rôle critique dans la cellule ; elle empêche l'agrégation des protéines nucléaires, elle régule l'assemblage des protéines ribosomales et est nécessaire pour la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Elle est aussi impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation telles qu'ARF (*ADP ribosylation factor*) et p53 (E Colombo et al. 2011). La façon dont la nucléoplasmine contribue à la leucémogénèse est encore floue mais de plus en plus d'éléments suggèrent que les LAM mutées pour NPM1 pourraient constituer un sous-type distinct de LAM avec des caractéristiques pathologiques, immunologiques et pronostiques spécifiques. Les LAM mutées NPM1 ont d'ailleurs été ajoutées comme entité provisoire dans le classement OMS de 2008 (Falini et al. 2011). De plus, les mutations dans NPM1 sont mutuellement exclusives avec d'autres anomalies récurrentes classées dans la catégorie *LAM avec anomalies génétiques récurrentes* mais sont significativement retrouvées avec la mutation FLT3-ITD. Cela suggère que NPM1 pourrait faire partie des mutations de type 2 (A Renneville et al. 2008). Les mutations NPM1 sans anomalie FLT3-ITD sont classées dans le groupe des anomalies génétiques avec pronostic favorable (Marcucci et al. 2011).

- **ASXL1** (*Additional Sex Comb-Like*) : Ce gène code pour une protéine impliquée dans la régulation du remodelage de la chromatine (S. Takahashi 2011a). La fonction de cette protéine dans les LAM est inconnue mais une étude (Chou et al. 2010) a révélé une fréquence de 10% de mutations de ce gène chez les patients testés.

- **WT1** (*Wilm's tumor 1*) : le gène WT1 code pour un facteur de transcription exprimé dans les progéniteurs CD34+ du système hématopoïétique mais pas dans les leucocytes matures. Il est fortement exprimé dans les LAM, son implication dans la leucémogenèse a donc été fortement étudiée. Mais bien que les mutations du gène WT1 aient été découvertes dans les hémopathies malignes il y a plus de 10 ans, le rôle précis de WT1 dans l'hématopoïèse normale et maligne n'est pas encore clairement défini. Il a été impliqué dans la régulation de la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation et il a été montré comme à la fois suppresseur de tumeur et oncogène. Ces différences pourraient s'expliquer par la variabilité des tissus étudiés et des différents transcrits possibles de WT1 (Owen et al. 2010). Les mutations de WT1 sont retrouvées dans 10% à 13% des LAM avec caryotype normal mais son impact pronostic n'est pas établi (certaines études rapportent un pronostic défavorable tandis que d'autres ne rapportent pas d'impact) (Marcucci et al. 2011).

- **BAALC** (*Brain And Acute Leukemia Cytoplasmatic*) : Il s'agit d'une protéine de fonction inconnue mais qui a pu être détectée à un taux d'expression particulièrement haut chez certains patients atteints de LAM. Plusieurs études ont démontré sa valeur pronostique avec une baisse de la survie globale pour ces patients (S. Scholl et al. 2009).

- **ERG** (Ets-related gene), **EVII** (Ecotropic viral integration 1), **MN1** (McNingiomal) : Une expression augmentée de ces trois gènes implique un pronostic défavorable selon plusieurs études. ERG est un effecteur en aval de plusieurs voies de régulation concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation. EVII entraîne des néoplasmes hématopoïétiques chez des modèles murins et enfin MN1 est un activateur de la transcription. Leurs rôles précis dans la leucémogenèse sont inconnus (S. Scholl et al. 2009).

- **TP53** : Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur ; il code pour la protéine p53 impliquée dans la surveillance de l'intégrité du génome. En effet, un dommage à l'ADN active ce facteur de transcription qui à son tour active la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. P53 est inactivée dans les LAM par des délétions et des mutations ponctuelles. Ces mutations entraînent une instabilité du génome et une inhibition de l'apoptose. Elles sont retrouvées dans moins de 10% de LAM *de novo* (A Renneville et al. 2008).

Les anomalies génétiques retrouvées dans les LAM sont diverses et concernent à la fois des translocations chromosomiques, des mutations ponctuelles, des duplications, des inversions. On remarque également l'implication de mécanismes épigénétiques dans la leucémogenèse. L'apparition d'un si grand nombre d'anomalies est très probablement liée à des instabilités dans le génome des blastes et ces perturbations pourraient résulter de dérégulations de gènes

impliqués dans le maintien de l'intégrité de la cellule et dans la réparation de l'ADN (A Renneville et al. 2008).

(4) L'EXPRESSION DES MIARNs

Les miARN (ou microARN), en s'hybridant sur leur ARNm cibles, sont capables d'inhiber l'expression des protéines codées par ces ARNm en induisant leur dégradation ou en inhibant de leur traduction. Ces miARN sont capables de réprimer des centaines de gènes et ainsi de réguler les processus cellulaires normaux. Leurs expressions aberrantes ou leurs dérégulations contribuent donc à la transformation maligne en interférant avec les voies de prolifération, de survie, de différenciation et d'apoptose (Lujambio & Lowe 2012). Il a d'ailleurs été montré que des profils particuliers d'expression de ces miARNs étaient retrouvés selon les cancers. Une étude (Mi et al. 2007), en 2007, a réussi à distinguer une leucémie aiguë lymphoblastique d'une leucémie aiguë myéloblastique uniquement sur le profil d'expression des miARN. La plupart des miARNs dérégulés joueraient un rôle dans la différenciation myéloïde et dans ses fonctions spécifiques. En ce qui concerne les LAM, on peut même discriminer entre plusieurs LAM avec anomalies caryotypiques uniquement par le profil miARN (Mrózek et al. 2009).

Les mêmes anomalies génomiques (telles que les arrangements chromosomiques, les délétions, les mutations ponctuelles) qui modifient l'activité des gènes codant pour des protéines, sont responsables des modifications d'activité des miARN. En effet, l'expression des miARN est corrélée à la présence de plusieurs anomalies récurrentes dans les LAM. Par exemple, les mutations dans NPM1 sont associées à l'augmentation de miR-10a, miR-10b et miR196a et tous résident dans la même partie du génome que les gènes HOX, eux aussi surexprimés dans les LAM avec NPM1 muté (Mrózek et al. 2009).

De même, la mutation FLT3-ITD a été associée avec l'augmentation de miR-155, or la surexpression de miR-155 a été montrée comme entraînant l'expansion des granulocytes et des monocytes et causant des symptômes caractéristiques des pathologies myéloïdes (Mrózek et al. 2009). Ces données qui relient l'expression des miARN à la pathogénicité laissent penser que ces miARNs pourraient agir comme suppresseurs de tumeurs ou comme oncogènes et contribuer à la leucémogénèse (Murray et al. 2012).

2. LES VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES DANS LES LAM

a) LES VOIES D'APOPTOSE

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique essentiel pour le développement normal et le maintien de l'homéostasie des tissus notamment dans les tissus à fort renouvellement tels que le tissu hématopoïétique. Les voies d'apoptoses convergent généralement *¹ vers l'activation des caspases, une famille de protéases intracellulaires, qui sont responsables du clivage protéolytique d'un large spectre de protéines. Ainsi elles entraînent la fragmentation de l'ADN et du cytosquelette, condensation cytoplasmique,

*¹ Il existe aussi des apoptoses dites « caspases indépendantes »

l'exposition de la phosphatidylsérine... et finalement mènent à la formation de corps apoptotiques. Il existe deux grands types de voies pour l'apoptose : la voie intrinsèque qui implique la mitochondrie et la voie extrinsèque qui implique les récepteurs de mort (Jerry M Adams 2003) (figure 4).

Figure 4 : Pas d'autorisation de diffusion

(1) LA VOIE D'APOPTOSE INTRINSEQUE : LA VOIE MITOCHONDRIALE ---

Cette voie d'apoptose est amorcée par divers stress intracellulaires. La décision de l'engagement de la cellule dans le processus de mort cellulaire se fait à la mitochondrie. En effet, sa perméabilisation va entraîner la libération de facteurs apoptogènes dans le cytoplasme notamment le cytochrome c. Ce dernier va former, avec APAF1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*), le complexe de l'apoptosome et va conduire à l'activation de la caspase 9 (caspase initiateur) qui à son tour va activer la caspase 3 (caspase exécutrice). Néanmoins, dans certains types de cellules au moins, la voie intrinsèque peut exister en l'absence de caspase 9 ou de son activateur (Richard J Youle & Andreas Strasser 2008). La régulation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale est assurée par les membres de la famille Bcl-2.

(a) FAMILLE BCL-2 ---

Cette famille peut-être séparée en deux catégories : les protéines à plusieurs domaines homologues à Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 et BH4) et les protéines qui n'ont que le domaine BH3 : les BH3 only. Ces BH3 only sont des protéines pro-apoptotiques (Bid (*BH3-Interacting-domain Death agonist*), Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*), Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bad (*Bcl2 Associated Death promoter*) et Noxa) et parmi les protéines multidomaines certaines sont pro-apoptotiques (Bax (*Bcl2 Associated X protein*) et Bak (*Bcl2 homologous Antagonist/Killer*) et d'autres anti-apoptotiques (Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*), Bcl-w, Bcl-xl...). Les protéines Bax et Bak sont les protéines effectrices de cette famille Bcl-2. En effet quand elles sont activées, elles changent de conformation et s'insèrent dans la membrane mitochondriale, s'oligomérisent et entraînent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* : MOMP) (Llambi et al. 2011).

(i) LES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES : BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1,A1 ---

-Rôle : Ils protègent la cellule de l'apoptose en empêchant l'action des effecteurs de la famille Bcl-2 : Bax et Bak. La surexpression de Bcl-2 dans des lignées hématopoïétiques

entraîne une augmentation de la survie des cellules progénitrices (Ogilvy et al. 1999) et son inactivation augmente l'apoptose (Veis et al. 1993).

-Structure : Ils ont une structure globalement proche des toxines bactériennes avec leurs deux hélices α hydrophobes centrales, leurs 6 à 7 hélices α amphipatiques et leur boucle non structurée. Leur domaine hydrophobe carboxy-terminal leur permet de s'insérer dans les membranes cellulaires : dans le réticulum endoplasmique (RE), l'enveloppe nucléaire et la membrane mitochondriale (Petros et al. 2004). Bien que Bcl-2 puisse bloquer l'apoptose à n'importe laquelle de ses localisations, ses fonctions sont moins claires au niveau du RE et de l'enveloppe nucléaire que celle à la mitochondrie (Richard J Youle & Andreas Strasser 2008).

-Régulation : Ces protéines peuvent être régulées dans la cellule au niveau transcriptionnel. Par exemple, la transcription de Bcl-xl peut être induite par les facteurs de croissance via la voie JAK/STAT et ainsi entraîner la survie cellulaire (Richard J Youle & Andreas Strasser 2008). Le niveau d'expression de Bcl-2 peut être régulé par les mi-ARN et son activité par phosphorylation. Mcl-1 a un turn-over important et son expression est fortement diminuée en cas d'activation du protéasome (J M Adams & Cory 2007).

(ii) LES MEMBRES PRO-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2

(a) LES BH3-ONLY

-Rôle : Les BH3-only sont des régulateurs clés de l'activation de Bax et Bak. Ils interagissent avec les autres membres de la famille Bcl-2, certains BH3-only pouvant interagir à la fois avec des membres pro-apoptotiques et des membres anti-apoptotiques et d'autres ne liant que certains membres anti-apoptotiques seulement.

-Structure : Les BH3-only ont un domaine homologue à Bcl-2 qui leur permet de lier et de réguler les membres de la famille Bcl-2. Néanmoins, mis à part Bid, toutes les BH3-only sont non structurées et seul leur motif BH3 se structure lors de la liaison avec leurs partenaires. Ainsi, Bid a, de façon surprenante, une structure très similaire à celles de Bcl-2, Bcl-xl et aussi avec Bax (Aisha Shamas-Din et al. 2011).

-Régulation : Ces BH3-only fonctionnent comme des capteurs des signaux pro-apoptotiques et leurs activations sont finement régulées dans la cellule selon différentes stratégies.

- Leur expression peut être régulée par des facteurs de transcription. Par exemple, Noxa et Puma sont induits par p53 en réponse à un dommage à l'ADN. Bim est exprimé via l'activation de Foxo3A (*class O Forkhead box transcription factor-3A*) en réponse à une privation de facteurs de croissance et par CEBP α en réponse à un stress du réticulum endoplasmique (Richard J Youle & Andreas Strasser 2008).

- Elles peuvent être régulées de façon post-traductionnelle. Par exemple, Bad est phosphorylé par différentes kinases de survie ce qui entraîne son inactivation. En effet, la capacité de Bad à lier ses partenaires anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w est inhibée par phosphorylation. Il existe trois sites de phosphorylation conservés dans cette protéine : un site sur la sérine 112 (S¹¹²), un autre sur la sérine 136 (S¹³⁶) et un dernier sur la sérine 155 (S¹⁵⁵). Ces sérines sont phosphorylées de façon séquentielles dans la cellule et entraînent l'interaction de Bad avec la protéine 14-3-3, une protéine chaperonne capable de lier une multitude de protéines de signalisation. La protéine Bad est alors séquestrée dans le cytoplasme et ne peut plus jouer son rôle pro-apoptotique. Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler Bad. Akt et p70S6 kinase sont capables de phosphoryler Bad en S¹³⁶, la protéine kinase A et la p90RSK le phosphoryle en S¹¹² et S¹⁵⁵ et enfin Pim sur la sérine S¹¹². Ces phosphorylations relient Bad aux voies PI3K/Akt, MAPK et Pim qui sont toutes des voies de survie cellulaire. Par ailleurs, certaines phosphatases (PP2A, PP1) sont capables de déphosphoryler Bad et ainsi de l'activer (Danial 2008).

Un autre exemple de cette régulation post-traductionnelle est le clivage de Bid. Bid peut être clivé par la caspase 8 lors de l'apoptose dépendante des récepteurs de mort mais aussi par la granzyme B, d'autres caspases que la caspase 8 et de multiples protéases (calpaïnes et cathepsines). Ce clivage en t-Bid entraîne sa migration vers la mitochondrie et la perméabilisation de cette dernière via l'activation de Bax et Bak (Billen et al. 2008).

(b) LES PROTEINES MULTIDOMAINES : BAX ET BAK

-Rôle : Bak et Bax sont responsables de la perméabilisation mitochondriale. Ils ont des actions redondantes mais l'un ou l'autre est absolument requis, ainsi en absence de Bax et de Bak cette perméabilisation ne se fait pas (M. C. Wei et al. 2001). Il n'est pas encore établi comment Bax et Bak peuvent entraîner cette perméabilisation et plusieurs hypothèses sont actuellement envisagées (Voir paragraphe la perméabilisation mitochondriale p 42) (Llambi & Douglas R Green 2011).

-Structure : Les structures de Bak et Bax non activés ont été résolues mais pas celles des formes actives de ces deux protéines. Sous forme inactive, Bak et Bax ont une structure similaire à celle des protéines anti-apoptotiques. Ce sont des protéines globulaires comprenant 9 hélices. L'hélice α 9 peut jouer le rôle de domaine transmembranaire et ancrer Bax et Bak dans la membrane mitochondriale. Dans la structure de Bax, l'hélice α est séquestrée dans le sillon hydrophobe ce qui explique la localisation cytoplasmique de Bax lorsque celui-ci est inactif. Dans la figure 5, l'hélice α 9 n'est pas visible dans la structure de Bak, il s'agit d'un problème de modélisation ; l'étroitesse du sillon et l'encombrement stérique peuvent expliquer ces difficultés (Westphal et al. 2011).

-Régulation : Bax est la plupart du temps localisé dans le cytoplasme et son activation va entraîner sa translocation vers la mitochondrie et son insertion dans la membrane externe mitochondriale. Au contraire, Bak est constitutivement inséré dans la membrane

mitochondriale externe. Leur activation va entraîner un changement de conformation et les régions nouvellement exposées vont permettre de nouvelles interactions et donc leur oligomérisation (Westphal et al. 2011).

Figure 5: Pas d'autorisation de diffusion

(iii) LES INTERACTIONS DE LA FAMILLE BCL-2 ET LA PERMEABILISATION MITOCHONDRIALE

(a) INTERACTIONS ANTI-APOPTOTIQUES ET PRO-APOPTOTIQUES

Les membres pro- et anti-apoptotiques s'antagonisent mutuellement à travers des interactions protéine-protéine. Du fait de la multitude de membres de la famille Bcl-2 et leur multiples interactions potentielles, il est difficile de déterminer quelles sont les interactions spécifiques entre les membres de cette famille.

–**Les membres anti-apoptotiques** de la famille Bcl-2 possèdent une poche hydrophobe caractéristique qui permet l'interaction avec le motif BH3 des BH3-only et leur séquestration. Certains membres anti-apoptotiques peuvent lier également Bak et Bax tel que Mcl-1 (*induced Myeloid leukaemia cell differentiation protein*), Bcl-xl et Bcl-2.

–**Les BH3-only** sont capables de lier des membres anti-apoptotiques (et pour certaines d'entre elles, telles que Bim et Bid (Du et al. 2011), également Bax et Bak.) Certains peuvent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques et d'autres sont plus spécifiques (figure 6).

Figure 6 : Pas d'autorisation de diffusion

–**Bax et Bak** sont les effecteurs de l'apoptose et l'intégration des signaux de mort ou de survie se fait par déplacement de l'équilibre entre les membres anti-apoptotiques et les BH3-only. Ces deux « équipes » se battent pour réguler Bax et Bak mais les modalités de ces régulations ne sont pas encore très claires ; il existe plusieurs modèles en compétition pour tenter de les clarifier :

- Le modèle de dérépression proposé par Willis en 2007 (Willis et al. 2007) suggère que les membres anti-apoptotiques lient en permanence Bax et Bak, qui sont supposés être toujours actifs ; l'induction de l'apoptose se fait lorsque la totalité du répertoire des anti-apoptotiques est neutralisé par les BH3-only.

- Le modèle d'activation directe en 2002 (Anthony Letai et al. 2002) propose que Bax et Bak soient activés par les BH3-only et qu'ainsi la neutralisation de ces BH3-only par les anti-apoptotiques empêche l'activation de Bax et Bak et donc empêche l'apoptose. Ce modèle divise les BH3-only en dérepresseurs/senseurs dont la seule fonction est de lier et donc d'inhiber les protéines anti-apoptotiques (ex : Bad) et d'autres en activateurs directs

(Bid, Bim) qui sont capables d'activer Bax et Bak en provoquant leur changement de conformation.

- En 2010, un troisième modèle est proposé par Leber (B Leber et al. 2010) : le modèle des protéines « incorporées ensemble » (*embedded together*). Il suggère que les protéines anti-apoptotiques agissent comme des régulateurs négatifs et dominants de Bax et Bak en liant les activateurs directs et les effecteurs dans les membranes, ainsi ils bloquent à la fois l'activation et l'oligomérisation. Ce modèle se base sur le fait que les interactions entre les membres de la famille Bcl-2 se font la plupart du temps à la membrane mitochondriale et que la liaison à la membrane entraîne un changement de conformation requis pour les interactions protéine-protéine.

En 2011, Douglas Green et son équipe (Llambi et al. 2011) propose un modèle compatible avec ces différentes hypothèses, qui inclut et complète les différents aspects de chacune d'elles. En utilisant des protéines chimériques portant ou non les motifs d'interaction avec les autres protéines de la famille Bcl-2, ils définissent deux modes par lesquels les anti-apoptotiques empêchent l'apoptose : mode 1 : séquestration des activateurs de Bax et Bak et mode 2 : séquestration de Bax et Bak activés eux même. Le mode 2 est plus efficace que le mode 1 ; le mode 1 nécessite plus de protéines anti-apoptotiques pour bloquer la perméabilisation membranaire que le mode 2. Les auteurs proposent une séquence dans l'activation de Bax et Bak : Bax (cytoplasmique) et Bak (mitochondrial) sont dans un état dormant, inactifs et dès la stimulation apoptotique, les BH3-only qui activent directement Bax et Bak sont synthétisés et séquestrés par le pool de protéines anti-apoptotiques. Ces interactions sont réversibles, ainsi il existe toujours une fraction de BH3-only activateurs directs libres. Quand le niveau de stress cellulaire est bas, la quantité de cette fraction libre est trop faible pour permettre l'activation de Bax/Bak. Par contre, dans les cas de stress cellulaire important, cette fraction est beaucoup plus grande et permet l'activation de Bax/Bak. Puisque le mode 2 (liaison directe entre les anti-apoptotiques et Bax/Bak) est plus efficace, les anti-apoptotiques vont alors séquestrer directement Bax/Bak. L'existence des modes 1 et 2 entraîne une translocation très rapide de Bax dans les cellules ayant un pool d'anti-apoptotiques bas alors que cette translocation sera retardée dans les cellules avec un pool important. Lorsque la quantité de BH3-only activateurs est assez importante, l'activation de Bax/Bak se fait en deux étapes : liaison avec les BH3-only activateurs et activation puis ces effecteurs Bax/Bak actifs vont activer d'autres effecteurs Bax/Bak inactifs entraînant ainsi une auto-activation. Le mode 2 est ainsi plus efficace que le mode 1 puisqu'il empêche cette auto-activation en liant directement Bax/Bak. En effet, les auteurs observent également que la liaison de Bak (et sûrement Bax même si cela n'a pas été testé) avec les anti-apoptotiques dans le mode 2 le bloque dans ce complexe et empêche son activation même si un BH3-only vient le lier et cela malgré le changement de conformation induit par le BH3-only. Ces observations sont cohérentes avec le modèle « embedded together » qui propose que les protéines anti-apoptotiques, les BH3-only et Bax/Bak soient présentes ensemble dans la membrane mitochondriale.

Si l'activation de Bax/Bak est encore sujet à discussion, la façon dont ils entraînent la perméabilisation mitochondriale et la libération du cytochrome c demeure elle aussi controversée.

(b) LA PERMEABILISATION MITOCHONDRIALE

Différents modèles sont proposés pour expliquer la perméabilisation mitochondriale par Bax et Bak. Ces modèles proposent que Bax, seul ou combiné à d'autres protéines, forme de larges canaux permettant le passage du cytochrome c et d'autres protéines.

- Dans un premier modèle, Bax et Bak modulent l'ouverture de canaux existant tels que le pore de perméabilité transitoire pour induire la perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie (MOMP). Néanmoins, des études génétiques supprimant la cyclophiline D (Nakagawa et al. 2005), un composant essentiel de ce pore de perméabilité transitoire, ont montré que cela n'empêchait pas l'action d'une variété de stimuli apoptotiques rendant peu probable l'implication de ce pore dans la MOMP induite par la famille Bcl-2.

- Un autre modèle propose que Bax et Bak forment des canaux ou des pores permettant la perméabilisation. Cette idée vient de l'étude tridimensionnelle des protéines de la famille Bcl-2. En effet certaines d'entre elles comme Bax, Bcl-xl et Bcl-2 ont une structure similaire à des toxines bactériennes capables de former des pores. En accord avec cette structure, Bax et Bcl-2 se sont montrés capables de former des pores dans une bicouche lipidique (Schlesinger et al. 1997). Des données plus récentes soutiennent la formation de pores par Bax et Bak. En effet, une étude de conductivité sur des mitochondries isolées contenant Bax et/ou Bak et dont on induit la perméabilisation montre que le pore formé augmente de taille et de conductivité au cours du temps et cela avec les mêmes caractéristiques que les mesures faites sur des cellules en apoptose (Martinez-Caballero et al. 2009). L'augmentation de la taille des pores par étapes est cohérent avec le modèle du recrutement séquentiel de Bax et Bak activés jusqu'à la formation d'un pore assez large pour le relargage du cytochrome c. L'utilisation d'inhibiteurs empêchant la formation de ces pores inhibe la perméabilisation mitochondriale et l'apoptose dans les cellules. Dans ce modèle, le pore formé par Bax et Bak serait de nature protéique adoptant une structure en baril, Bax et Bak se positionnant perpendiculairement dans la membrane formant une structure par laquelle passe la lumière du pore (figure 7). Néanmoins, des questions subsistent dans ce modèle, notamment en ce qui concerne la taille des pores formés qui permettent le relargage du cytochrome c mais pas de plus grosses protéines alors que c'est le cas dans la MOMP (Stephen W G Tait & Douglas R Green 2010).

Figure 7 : Pas d'autorisation de diffusion

- Un modèle alternatif est que les pores formés par Bax et Bak seraient de nature lipidique. L'interaction de Bax et Bak actifs avec la membrane lipidique entraînerait une courbure de cette dernière et formerait un pore lipidique par une continuité entre les feuillets

des membranes interne et externe. Ce pore est linéarisé à la fois par Bax et Bak et par les lipides (figure 7). Les éléments en faveur de ces pores lipidiques sont qu'ils recouvrent plusieurs aspects clés de la MOMP tels que le relargage de grosses protéines et expliquerait la difficulté de visualiser des pores protéiques dans la membrane mitochondriale (Stephen W G Tait & Douglas R Green 2010). Récemment des études de perméabilisation de liposomes par Bax ont montré que les pores formés étaient de tailles très variables allant jusqu'à 100 nm. Cela n'est pas possible dans le cas d'un pore protéique, dans lequel la taille est limitée par une déstabilisation de la structure lorsque le nombre de peptides est trop important. Au contraire, la grande stabilité des pores lipidiques leur permet d'atteindre un diamètre plus important (Westphal et al. 2011).

Par ailleurs, il a été récemment découvert que la famille Bcl-2 module l'équilibre entre la fission et la fusion.

La mitochondrie est constamment remodelée via des événements de fission (fragmentation) et de fusion (regroupement). On ne connaît pas le rôle de ces remaniements dans la cellule normale mais la fission a été récemment associée à la perméabilisation mitochondriale dans pratiquement tous les types cellulaires et en réponse à la plupart des stimuli apoptotiques (Castanier & Arnoult 2010).

Cette fragmentation du réseau mitochondrial nécessite les effecteurs de la machinerie de fission et de fusion mitochondriale et fait suite soit à une augmentation de la fission soit à une diminution de la fusion soit les deux. En 2001, Franck et collègues ont découvert que la réduction de la fragmentation mitochondriale, en inhibant Drp1 (*Dynamin-related protein 1*), une protéine de la machinerie de fission mitochondriale, inhibe la libération du cytochrome c et retarde l'induction de l'apoptose (Frank et al. 2001). De plus, il a également été montré que les formes activées de Bax étaient localisées aux sites de scission des mitochondries lors de l'apoptose. Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la fragmentation mitochondriale induite par Bax/Bak pourrait contribuer à la perméabilisation mitochondriale. Néanmoins, une étude récente de fibroblastes de souris knock-out pour Drp1 a montré que ces cellules étaient toujours capables d'entrer en apoptose en réponse à divers stimuli même si le relargage du cytochrome c est, dans ce cas aussi, retardé (Landes & Martinou 2011). Ainsi, Drp1 semble participer à la libération du cytochrome c mais n'est pas indispensable à l'apoptose. L'inhibition de la fragmentation mitochondriale par activation de la machinerie de fusion est capable également de diminuer le taux d'apoptose. Cela laisse penser que les changements morphologiques de la membrane mitochondriale sont peut-être plus impliqués que les effets directs des effecteurs de cette machinerie. Néanmoins, on ne sait pas de quelle façon ces changements morphologiques pourraient intervenir dans l'apoptose ; ils pourraient participer à l'oligomérisation de Bax ou encore à la mobilisation du pool de cytochrome c présent dans les crêtes des membranes mitochondriales (Landes & Martinou 2011).

En plus d'entraîner l'inhibition de la chaîne respiratoire et donc la déplétion en ATP et la production de ROS, la perméabilisation mitochondriale entraîne la libération du cytochrome c et de plusieurs protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire :

–**Le cytochrome c** lie APAF1 induisant son changement de conformation, son oligomérisation et finalement entraînant la formation de la plateforme d'activation des caspases appelée apoptosome. Ce complexe recrute, dimérise et active une caspase initiateur appelée caspase 9 qui à son tour clive et active les caspases effectrices 3 et 7.

–**Smac/DIABLO** (*Second mitochondrial activator of caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low PI*) et **Omi/HtrA2** (*High temperature requirement protein A2*) capables d'inhiber les membres de la famille IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) dont XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*). XIAP inhibe directement les caspases par interaction entre son domaine BIR (*Baculovirus Inhibitor Repeat*) et le domaine IBM (*IAP-Binding Motif*) des caspases. Il contrôle leur activité catalytique après leur activation en masquant leur site de liaison aux substrats (C. Maas et al. 2010). HtrA2 est également capable d'avoir un effet pro-apoptotique indépendamment des caspases grâce à son activité sérine protéase (Galluzzi et al. 2012).

–**AIF** (*Apoptosis Inducing Factor*) : après sa libération de la mitochondrie, AIF est transloqué au noyau où il entraîne la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Il est impliqué également dans des processus de mort cellulaire indépendants des caspases.

– **Endonucléase G** : Cette protéine est capable de cliver l'ADN de façon inter- et intranucléosomale.

Une autre grande voie d'apoptose est la voie des récepteurs de mort. Cette voie est induite par des facteurs externes et est impliquée dans la régulation de l'homéostasie des tissus.

(2) LA VOIE D'APOPTOSE EXTRINSEQUE

La voie d'apoptose extrinsèque est amorcée par l'activation des récepteurs de mort localisés à la membrane cellulaire par leur ligand. Il s'agit des récepteurs : **TNF-R1** (TNF : *Tumor Necrosis Factor*) dont le ligand est TNF- α , **CD95** (appelé aussi Fas, APO-1) avec pour ligand CD95-ligand (ou FAS-ligand), **TRAIL-R1** et **TRAIL-R2** (TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*, ces récepteurs sont nommés également DR4 et DR5 (*Death Receptor 4* et *5*) dont le ligand est TRAIL et également les récepteurs **TRAMP** (*TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*) dont le ligand est TL1A. **DR6** est aussi un récepteur à domaine de mort mais dont le ligand est inconnu et les voies activées en aval également peu connues.

Les signaux extrinsèques peuvent également être médiés par les récepteurs à dépendance. Ces récepteurs ont été découverts en 1998 par Mehlen et ont un fonctionnement tout à fait particulier.

(a) LES RECEPTEURS DE MORT

Ces récepteurs font partie de la super-famille des récepteurs TNF et leurs parties intracellulaires sont caractérisées par la présence d'un domaine d'interaction protéine-protéine appelé domaine de mort. Deux types de récepteurs à domaine de mort existent : les récepteurs dont l'activation par leur ligand entraîne le recrutement de FADD (*FAS-Associated Death Domain*) et les récepteurs dont l'activation entraîne le recrutement de TRADD (*Tumors necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain*).

(i) CARACTERISTIQUES

(a) LES RECEPTEURS QUI RECRUTENT DIRECTEMENT FADD

L'adaptateur FADD est recruté dans les cas des récepteurs **FAS**, **TRAIL-R1** et **TRAIL R-2**. FADD contient à la fois un domaine de mort qui lui permet d'interagir avec la partie intracellulaire du récepteur et un autre domaine d'interaction protéine-protéine le domaine DED (*Death Effector Domaine*) qui lui permet de recruter les caspases initiateuses 8 ou 10, c-FLIP (un inhibiteur de ces caspases), RIP1 (*Receptor-Interacting Protein 1*), cIAPs (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein*) et l'ubiquitine ligase E3, capable d'interférer avec l'activation des caspases (Galluzzi et al. 2012). Ce complexe formé est appelé DISC pour *Death-Inducing Signaling Complex* et la dimérisation des caspases lors de leur recrutement dans le DISC entraîne leur activation (Kantari & Walczak 2011).

Néanmoins, de nombreuses inconnues demeurent dans le mécanisme de formation et d'activation de ce complexe DISC.

Tout d'abord, différentes structures du complexe formé par FAS et FADD ont été décrites. Une étude (Scott et al. 2009) suggère que la liaison de FAS-L sur son récepteur induit une ouverture du domaine de mort de ce dernier, ce qui permet la liaison avec FADD, et que simultanément une dimérisation entre deux FAS-R s'effectue. Selon cette étude une unité de ce complexe contient quatre adaptateurs FADD et quatre récepteurs FAS. Une autre étude (Liwei Wang et al. 2010), cependant, suggère que le complexe DISC comprend 5 à 7 récepteurs FAS et 5 adaptateurs FADD.

Récemment, la formation d'un second complexe (comme dans les cas des récepteurs TNF-R1 et TRAMP, voir paragraphe suivant p 46) contenant l'adaptateur FADD, la pro-caspase 8 et c-FLIP mais qui ne contient plus le récepteur FAS a été décrit. Ce complexe est formé quelques minutes après activation du récepteur et semble contribuer à l'activation de la caspase 8. Néanmoins, la quantité de caspase 8 activée dans ce complexe II et dans le DISC n'a pas été déterminée (Lavrik & Krammer 2012).

Figure 8 : Pas d'autorisation de diffusion

L'inhibiteur c-FLIP est présent dans le complexe du DISC, il est l'inhibiteur majoritaire de la caspase 8 et il est également impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B. Il existe 3 isoformes de c-FLIP et deux produits de clivage. Les trois isoformes possèdent des domaines DED qui

leur permet de lier le DISC, elles sont capables d'inhiber l'activation de la pro-caspase 8 et ainsi bloquent l'apoptose. Les produits de clivage sont le résultat de l'action de la pro-caspase 8 et ils entraînent l'activation de la voie. La pro-caspase 8 et le c-FLIP étant en compétition pour la fixation au DISC et l'activation de pro-caspase 8 et de c-FLIP se faisant à ce niveau, selon les quantités de pro-caspase 8 et de c-FLIP, la voie apoptotique ou la voie NF- κ B (voie de survie) est induite. Dans le cas d'une faible quantité de c-FLIP présente au niveau du DISC très peu de produit de clivage de c-FLIP peut être généré et la voie apoptotique est enclenchée. Si la quantité de produits de clivage de c-FLIP augmente, l'activation de NF- κ B augmente également. Mais dans le cas d'une grande quantité de c-FLIP, le recrutement de la pro-caspase 8 ne peut pas se faire et les produits de clivage de c-FLIP ne peuvent pas exister et ainsi la voie apoptotique et la voie de NF- κ B sont bloquées. En conséquence, l'activation de l'une ou l'autre de ces voies ne suit pas une dynamique linéaire (Lavrik & Krammer 2012).

(b) LES RECEPTEURS NECESSITANT LE RECRUTEMENT DE TRADD PUIS DE FADD

L'adaptateur TRADD est recruté dans les cas des récepteurs **TNF-R1** et **TRAMP**. Le recrutement d'autres molécules telles que RIP, TRAF2 et c-IAP1 entraîne la formation d'un complexe appelé complexe I, capable d'induire la voie de NF- κ B et ainsi d'entraîner la régulation de l'inflammation et la survie de la cellule en induisant la transcription de gènes anti-apoptotiques. Néanmoins, simultanément TRADD, RIP et TRAF2 se dissocient de TNF-R1 et forment un second complexe appelé complexe II avec l'adaptateur FADD qui permet le recrutement des caspases 8 et 10 et entraîne l'apoptose. Le maintien de la cellule ou sa mort dépend ainsi de l'équilibre entre les complexes I et II mais les mécanismes de cet équilibre ne sont pas encore bien compris (J Li & J. Yuan 2008). Très récemment, l'ubiquitination de certains composants du complexe I a été impliquée à la fois dans l'activation des voies NF- κ B et MAPK mais aussi dans le maintien de ce complexe I (Walczak 2011). En effet, RIP1 est ubiquitylé par les c-IAPs autorisant le recrutement de la kinase activée par TGF β (TAK1 : *Transforming growth factor β -Activated Kinase 1*), TAB2 (*TAK1-Binding protein 2*) et TAB3 qui ensemble peuvent activer la voie NF- κ B.

(ii) LA DUALITE DE CES RECEPTEURS

(a) DUALITE SURVIE-MORT

L'activation des voies NF- κ B et MAPK est observée dans l'apoptose médiée par FAS, TNF-R1 et TRAMP. L'activation des récepteurs de mort n'entraîne donc pas toujours un signal de mort (Galluzzi et al. 2012). Ces activations semblent être régulées via la compartimentation de ces récepteurs. En effet, l'internalisation par endocytose dépendante de la clathrine semble être nécessaire pour l'induction des signaux d'apoptose à partir du compartiment endosomal. Les signaux de survie médiés par NF- κ B ou MAPK s'initient indépendamment de l'internalisation des récepteurs via la liaison de RIP et TRAF2 à TNF-R1 ou le faible taux de recrutement de la caspase 8 au récepteur FAS. L'endocytose pourrait ainsi

« orchestrer » ainsi la signalisation cellulaire en intégrant les différents signaux à la surface des endosomes (Schütze et al. 2008).

(b) DUALITE EXTRINSEQUE-INTRINSEQUE

Dans certains types cellulaires, appelées cellules de type I, l'activation de la caspase 8 par le DISC est suffisant pour activer les caspases effectrices en aval telles que caspase 3 et caspase 7 et ainsi entraîner l'apoptose. Dans les cellules appelées cellules de type II, la voie des récepteurs de mort doit être amplifiée par une activation de la voie mitochondriale pour entraîner l'apoptose. Dans ce cas, la caspase 8 clive la protéine BH3-only Bid et le Bid tronqué (t-Bid) est capable de transloquer vers la mitochondrie et d'induire la voie intrinsèque si les taux de protéines pro- et anti-apoptotiques le permettent. En effet, le clivage de Bid semble induire un changement de conformation permettant l'exposition de résidus hydrophobes, l'insertion dans la membrane mitochondriale et l'interaction de t-Bid avec les autres protéines de la famille Bcl-2 (Kantari & Walczak 2011).

La différence entre les cellules de type I et de type II était expliquée au départ uniquement par l'efficacité d'activation de la caspase 8 au niveau du complexe du DISC, importante dans les cellules de type I et faible dans les cellules de type II. Mais récemment Jost et son équipe ont montré que les niveaux d'expression de XIAP pouvaient permettre la discrimination entre le type I et le type II dans le cas de l'apoptose médiée via FAS (Philipp J Jost et al. 2009). XIAP peut inhiber l'apoptose en liant et inactivant certaines caspases telles que les caspases 3, 7 et 9. Dans les cellules de type II, la quantité de XIAP est importante et l'induction de l'apoptose ne peut se faire que si XIAP est neutralisé par son inhibiteur Smac/DIABLO. Ce dernier est libéré lors de la perméabilisation mitochondriale, ainsi l'activation de la voie intrinsèque par t-BID est nécessaire dans les cellules de type II (T Kaufmann et al. 2012).

(b) LES RECEPTEURS A DEPENDANCE

Les signaux extrinsèques peuvent également être médiés par les récepteurs à dépendance (« *dependence receptors* ») qui entraînent la survie de la cellule lorsque leur ligand est présent et la mort lorsqu'il est absent. Il existe plus d'une douzaine de récepteurs identifiés dans cette famille comme par exemple DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) et UNC5A-D (*UNCoordinated 5 homologs*). Ils entraînent une activation rapide des caspases en absence de leur ligand. La façon dont ils entraînent l'activation et l'amplification de la signalisation des caspases commence à être comprise pour certaines d'entre eux. Ils ne fonctionnent pas tous de la même façon, certains entraînant la formation de plateforme d'activation des caspases (par exemple DCC), d'autres faisant appel à une signalisation plus complexe tel que UNC5A-D qui implique la phosphatase PP2A et la kinase DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) (Goldschneider & Mehlen 2010).

Nombre de points restent donc à éclaircir concernant la voie des récepteurs de mort. Notamment le rôle de la caspase 10 qui est très homologue à la caspase 8 et est activée

également au niveau du DISC mais qui ne semble pas se substituer à la caspase 8 en son absence.(Galluzzi et al. 2012) De plus, elle a été récemment impliquée dans la mort cellulaire induite par les récepteurs de mort en présence d'inhibiteurs de caspases (Lafont et al. 2010).

(3) LES CASPASES ET LEURS SUBSTRATS

Les voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque mènent généralement à l'activation des caspases. Ces protéases sont les protéines effectrices de l'apoptose, elles sont capables de cliver un motif spécifique, contenant un aspartate, de multiples substrats dans la cellule et sont responsables des caractéristiques morphologiques et biochimiques associées à l'apoptose. Elles sont synthétisées sous forme de zymogène et nécessitent une activation pour effectuer leurs rôles dans l'apoptose. La voie intrinsèque mène à l'activation de la caspase initiateur 9 et la voie extrinsèque à l'activation de la caspase initiateur 8. Ces caspases initiateurs sont activées au niveau de différents complexes : Apaf-1 pour la caspase 9 et DISC pour la caspase 8. Une fois activées les caspases initiateurs activent les caspases effectrices telles que les caspases 3 et 7.

Néanmoins, le mécanisme d'activation des caspases initiateurs 8 et 9 au niveau des différentes plateformes n'est pas encore totalement résolu :

- **Activation de la caspase 8** sur la plateforme du DISC : deux isoformes de la pro-caspase 8 (pro-caspase 8a et pro-caspase 8b, la pro-caspase 8a ayant 15 acides aminés supplémentaires par rapport à la pro-caspase 8b) ont été reportées comme étant liées au DISC. Cette liaison entraîne leur activation via leur homodimérisation dans le DISC, chaque homodimère active un autre homodimère. Mais cette activation initiale ne suffit pas à la caspase 8 pour être complètement active ; une série de clivages est nécessaire et entraîne l'apparition de fragments qui possèdent une activité catalytique et sont capables de cliver des substrats pro-apoptotiques tels que la caspase 3 et Bid. Récemment, des phosphorylations de la pro-caspase 8 ont été décrites et semblent avoir un rôle important dans l'inhibition de l'activation cette caspase. Des polyubiquinations ont aussi été décrites et qui pourraient participer au processus apoptotique en stabilisant la caspase 8 activée (Lavrik & Krammer 2012).

- **Concernant la caspase 9**, son activation se fait au niveau de l'apoptosome. L'apoptosome est une plateforme formée d'Apaf-1 oligomérisé dont le domaine CARD (*Caspase Activation Recruitment Domain*) sert à recruter le domaine CARD de la pro-caspase 9. La dimérisation de la pro-caspase 9 est essentielle à son activation et il a été proposé que celle-ci soit favorisée par l'accumulation locale de pro-caspase 9 entraînée par son recrutement au niveau de l'apoptosome. Cette dimérisation est accompagnée d'un clivage autocatalytique mais ce clivage pourrait ne pas être essentiel à l'activité caspase 9. En effet, l'étude de mutants non clivables de la pro-caspase 9 n'a pas montré de différence d'activité par rapport aux pro-caspases clivables (Stennicke et al. 1999). L'apoptosome semble jouer d'autres rôles dans l'activation de la pro-caspase 9 puisque l'activité normale de cette caspase ne peut pas être retrouvée par une dimérisation artificielle (Y. Chao et al. 2005). Par ailleurs,

l'affinité de la pro-caspase pour l'apoptosome est dix fois supérieure à celle de la caspase clivée. Ainsi, la pro-caspase 9 déplace la caspase 9 activée de l'apoptosome et cela permet d'inscrire l'activation de cette caspase dans un temps déterminé : lorsqu'il n'y a plus de pro-caspase 9, seule une petite fraction de caspase 9 activée est encore liée à l'apoptosome (Maximilian L Würstle et al. 2012).

L'activation des caspases effectrices se fait par clivage après un aspartate spécifique par les caspases initiateuses. Une fois activées les caspases effectrices clivent un nombre très important de substrats dans la cellule (Chowdhury et al. 2008) :

- Des protéines structurales du cytosquelette (actine, β -caténine...) et du noyau (lamine A, B, NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein...))
- Des protéines du métabolisme et de réparation de l'ADN (PARP, DNA-PK, topoisomérases, RNA polymérases...)
- Des protéines kinases (PKC, MAPK, ERK, Akt, Wee1)
- Des protéines de signalisation de type cytokines, phospholipases
- Des protéines du cycle (p21, p27, pRB)
- Des protéines impliquées dans l'apoptose (BID, Mcl-1...)

En tout, il existe plus de 280 substrats identifiés des caspases. Pour la plupart de ces substrats, la seule conséquence connue est l'inhibition de leur fonction mais pour d'autres substrats les conséquences fonctionnelles ont été identifiées ; le clivage par les caspases leur apportant de nouveaux rôles dans la cellule.

En voici quelques exemples :

- Protéines du métabolisme et de réparation de l'ADN

- **CAD/ICAD** (*Caspase Activated DNase/Inhibitor of CAD*) : CAD est une endonucléase spécifique de l'ADN double brin dont l'activation entraîne des clivages des deux brins de l'ADN. Cette endonucléase ne peut couper qu'entre les nucléosomes et donne des fragments d'ADN multiples de 180 pb (nombre de paires de bases entre deux nucléosomes). Cette fragmentation donne un profil particulier en électrophorèse : une migration en échelle (« *DNA ladder* »). ICAD est une protéine chaperonne spécifique de CAD qui inhibe son activité DNase. Le complexe CAD/ICAD inactif est présent dans le noyau et lors de l'apoptose la caspase 3 clive ICAD ce qui libère CAD qui peut alors jouer son rôle d'endonucléase.

CAD n'est pas la seule nucléase impliquée dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose. L'endonucléase G, libérée lors de la perméabilisation mitochondriale, est capable de cliver l'ADN de façon inter- et intra-nucléosomale (Kitazumi & Tsukahara 2011).

- **PARP-1** (*Poly (ADP-ribose) polymerase*) : PARP est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité

du génome, elle est notamment activée lors de dommages à l'ADN. Lors de l'apoptose, PARP est clivée par la caspase 3 ce qui l'empêche de jouer son rôle.

- Protéines Kinases

- **P70S6K** : Cette kinase fait partie de la famille des « 70kDa ribosomal protein S6 kinases » au départ identifiée pour sa capacité à phosphoryler une protéine ribosomale appelée S6. Située en aval de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), cette kinase est activée en réponse aux facteurs de croissance, aux cytokines et aux nutriments. Elle est capable d'activer de multiples substrats, et est ainsi impliquée dans la synthèse protéique, l'homéostasie du glucose, la croissance et la survie cellulaire (Fenton & Gout 2011). Un article récent rapporte que cette kinase est un substrat de la caspase 3 et que son clivage est important pour l'induction de l'apoptose médiée par différents stimuli. Néanmoins, le rôle exact de ce clivage dans l'apoptose reste à déterminer (Dhar et al. 2009).

- **Akt** : Akt-1 est une kinase impliquée dans de multiples processus dans la cellule tels que la régulation de la prolifération et la survie. Lors de l'apoptose, cette kinase est clivée par la caspase 3 ce qui pourrait entraîner sa perte de fonction. De plus, la phosphorylation d'Akt-1 (qui entraîne son activation) inhibe ce clivage suggérant que cette phosphorylation, en plus de son rôle d'activation d'Akt-1 en conditions normales, pourrait être un mécanisme de défense de la cellule contre l'apoptose (Jahani-Asl et al. 2007).

- Protéines impliquées dans l'apoptose

- **Bid** : Bid est clivé par la caspase 8 et le Bid tronqué est capable d'entraîner l'induction de l'apoptose mitochondriale (voir paragraphe voie d'apoptose extrinsèque p 44).

- **Mcl-1** : Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique clivée lors de l'apoptose par différentes caspases et notamment par la caspase 3. Le produit de clivage Mcl-1^{128, 350} ressemble à Bax avec ses domaines BH1, BH2 et BH3. Il est capable d'interagir avec Bax et de l'activer et ainsi d'entraîner une apoptose mitochondriale. Ce rôle pro-apoptotique de Mcl-1 semble être partagé par de nombreux types cellulaires et induit par de nombreux stimuli apoptotiques (Ménoret et al. 2010, p.12).

- **Bcl-2 et Bcl-xl** : Ces protéines anti-apoptotiques semblent également être clivées par les caspases lors de l'apoptose et les fragments obtenus ont été également impliqués dans l'induction de l'apoptose mitochondriale (Kirsch et al. 1999) (Basañez et al. 2001).

Les différentes caspases ont des substrats communs et les cellules ont ainsi plusieurs possibilités pour cliver un substrat. Néanmoins, ces caspases font preuve d'activité différente en fonction des substrats et leurs localisations dans la cellule participent aussi à cette distinction fonctionnelle. Ainsi, les distributions différentes des caspases dans les cellules expliquent que l'on ne retrouve pas tous les clivages dans tous les types cellulaires (U. Fischer et al. 2003).

La dérégulation de l'apoptose rompt le complexe équilibre entre la prolifération, la survie et la mort cellulaire et joue un rôle majeur dans le développement de maladies telles que le cancer. Le détournement du programme de mort cellulaire est une des six altérations majeures de la physiologie cellulaire qui entraîne la croissance des tumeurs (Hanahan & Weinberg 2000)(figure 9). De plus, les cellules dont les voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire sont altérées, sont fréquemment plus résistantes aux traitements car les agents chimiothérapeutiques agissent principalement en induisant l'apoptose (Ugo Testa & Roberta Riccioni 2007).

Les altérations caractérisant les cancers d'après Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg
<input type="checkbox"/> Indépendance vis-à-vis des facteurs de prolifération
<input type="checkbox"/> Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs
<input type="checkbox"/> Résistance à l'apoptose
<input type="checkbox"/> Acquisition d'un potentiel de prolifération illimité
<input type="checkbox"/> Induction de l'angiogénèse
<input type="checkbox"/> Capacité d'invasion tissulaire et de formation de métastases

Figure 9 : Les 6 altérations caractéristiques des cancers. Adapté de "The Hallmarks of Cancer" Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg (Hanahan & Weinberg 2000)

(a) ANOMALIES DANS LES EFFECTEURS DE LA
VOIE INTRINSEQUE

.....

– **Bcl-2** : La surexpression de Bcl-2 a été observée dans les cellules de patients atteints de LAM notamment dans les cellules exprimant CD34+ (Venditti et al. 2004). De plus, un haut ratio de Bcl-2/Bax a été montré comme étant prédictif d'un pronostic défavorable (Del Poeta et al. 2003). Dans les LAM avec anomalies RUNX1/ETO, la surexpression de Bcl-2 est due à l'action de ce facteur de transcription muté qui active la transcription de Bcl-2 au niveau de son promoteur (Klampfer et al. 1996).

– **Bcl-xl** : La surexpression de Bcl-xl est aussi observée dans les LAM et est en relation avec des mutations des récepteurs FLT3 et c-Kit. La mutation de FLT3 entraîne l'activation de multiples voies dont la voie JAK/STAT avec l'activation du facteur de transcription STAT5. Ce facteur de transcription a pour cible le promoteur de Bcl-xl et entraîne sa transcription (Bagrintseva et al. 2005). Les mutations dans le récepteur c-Kit entraînent une activité constitutive de STAT3 et la surexpression de Bcl-xl (Ning et al. 2001).

– **Apaf-1** : Les cellules leucémiques expriment peu d'Apaf-1. Cette expression réduite est due à la diminution des ARNm codant pour Apaf-1 elle-même due à une hyperméthylation du gène codant pour Apaf-1 (Yutaka Furukawa et al. 2005).

(b) ANOMALIES DANS LES EFFECTEURS DE LA VOIE EXTRINSEQUE

–**FADD** : Une étude en 2004 de l'expression de FADD dans des blastes de LAM a montré qu'une partie importante de ces cellules (37%) expriment peu ou pas de FADD. Cette moindre expression de FADD est associée à un pronostic défavorable (Tourneur et al. 2004). Cela pourrait expliquer les résistances observées dans cellules LAM à l'apoptose médiée par TRAIL ou par FAS (Ugo Testa & Roberta Riccioni 2007).

–**TRAIL** : Les cellules LAM sont résistantes à la mort cellulaire induite par TRAIL. Les mécanismes de cette résistance ne sont pas bien connus ; elle peut être dû à la moindre expression de FADD mais d'autres facteurs semblent être également en jeu.

L'analyse de l'expression des ARNm codant pour les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et les récepteurs « leurres » (*decoy*) TRAIL-R3 et TRAIL-R4 (qui sont des récepteurs qui n'ont pas de domaine de mort fonctionnel et qui sont donc inhibiteurs des autres récepteurs TRAIL) n'a pas montré de corrélation entre cette expression et le caractère sensible ou non à la mort médiée par TRAIL (Wuchter et al. 2001). Néanmoins, d'autres études analysant l'expression de ces récepteurs au niveau membranaire, ont montré une corrélation entre l'expression des récepteurs leurres, l'expression moindre de TRAIL-R1 et la résistance à TRAIL (Chamuleau et al. 2011) (R. Riccioni et al. 2005).

La sur-activation de la voie PI3K/Akt aurait également un rôle et notamment l'activation constitutive d'Akt-1 serait en jeu. Dans son étude, l'équipe de Martelli montre que les cellules HL60 résistantes à TRAIL ont une suractivation d'Akt-1 et que l'inhibition de cette dernière restaure la sensibilité (R Bortul et al. 2003). En accord avec cette implication d'Akt-1, des inhibiteurs d'Akt telle que la périfosine sensibilise les cellules LAM à la mort cellulaire médiée par TRAIL (Pier Luigi Tazzari et al. 2008).

Les hauts taux de c-FLIP et l'activation de NF- κ B seraient également des marqueurs de la résistance. Dans leur étude Martelli et collègues observent une association entre la résistance à TRAIL et des taux importants de c-FLIP et l'activation de la voie NF- κ B. L'inhibition de c-FLIP et de NF- κ B restaure la sensibilité (R Bortul et al. 2003).

(c) ANOMALIES DANS L'ACTIVATION DES CASPASES

–**XIAP et survivine** : Ces deux protéines appartiennent à la famille des IAP qui a pour rôle d'inhiber l'apoptose dépendante des caspases. Cette famille inhibe ainsi l'apoptose mitochondriale et l'apoptose dépendante des récepteurs de mort. Ces protéines sont capables d'interagir directement avec les caspases par l'intermédiaire de leurs domaines BIR et d'inhiber leur activité (Wrzesień-Kuś et al. 2004). Il a été récemment décrit que XIAP pouvait également entraîner l'ubiquitination de certaines caspases et ainsi leur adressage au protéasome (Y Yang et al. 2000). De plus, XIAP a un rôle dans l'activation de la voie NF- κ B. La survivine, elle, a une expression dépendante du cycle cellulaire et pourrait réguler

l'apoptose en régulant p21 (Fukuda et al. 2004) et peut-être également en régulant la libération de AIF (T. Liu et al. 2004).

La surexpression des IAP est observée dans une large variété de cancers dont les leucémies, dans les lignées cellulaires et dans les cellules primaires provenant de prélèvements de patients atteints de LAM. La valeur pronostique de cette surexpression est encore en débat car certaines études indiquent une corrélation entre les hauts niveaux de ces protéines et un pronostic défavorable tandis que d'autres non (Wrzesień-Kuś et al. 2004).

– **Caspase 3** : Les niveaux de pro-caspase 3 sont élevés dans les LAM et cela est corrélé à un mauvais pronostic. Cette observation pourrait être due à un défaut d'activation de la pro-caspase 3 entraînant une accumulation de caspase 3 non active (Ugo Testa & Roberta Riccioni 2007).

b) LES VOIES DE SURVIE

(1) LA VOIE PI3K/AKT

(a) BIOLOGIE GENERALE DE LA VOIE PI3K/AKT

(i) ACTIVATION ET REGULATION

La famille PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*) constitue une grande famille de kinases capables de phosphoryler des phosphatidylinositols sur leur inositol en 3'OH. Il existe trois classes de PI3Ks selon leur structure, leur fonction et leur spécificité de substrat. La classe I A est la classe concernée par des dérégulations dans les cancers (Hennessy et al. 2005). Ces enzymes existent sous forme d'hétérodimères ; une sous-unité inhibitrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). Cette classe de PI3K est activée par les facteurs de croissance via l'activation des récepteurs à tyrosine kinase. La sous-unité régulatrice lie directement les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur et/ou de ces adaptateurs. Cette liaison lève l'inhibition de cette sous-unité régulatrice sur la sous-unité catalytique et, une fois activée, cette sous-unité phosphoryle le Phosphatidylinositol-4,5-bisPhosphate (PIP2) en Phosphatidylinositol-3,4,5-triPhosphate (PIP3). PIP3 est un second messager capable de recruter à la membrane plasmique les protéines contenant un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) telles qu'Akt et PDK1 (*Phosphoinositide-Dependant protein Kinase 1*). Akt est alors activée par phosphorylation par PDK1 puis par mTORC2 et va à son tour activer différentes protéines. Akt est ainsi le point de départ de plusieurs cascades d'activations menant à la survie cellulaire et à la prolifération. La sous-unité p110 peut également être activée par RAS ou par des récepteurs à protéines G. L'activation de cette voie PI3K/Akt est finement régulée notamment par des phosphatases telles que PTEN (*Phosphatase and TENsin Homologue*) ou SHIP-1 (*SH2 domain containing inositol phosphatase-1*) capables de déphosphoryler PIP3 en PIP2.

Figure 10 : Pas d'autorisation de diffusion

L'activation d'Akt entraîne la survie de la cellule via de multiples mécanismes :

– **Bad** : Akt phosphoryle Bad, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (voir paragraphe famille Bcl-2 p 37). Bad, par sa capacité à séquestrer Bcl-xl, Bcl-2 et Bcl-w inhibe leur activité anti-apoptotique et entraîne l'apoptose. Sa phosphorylation par Akt sur la sérine 136 entraîne son interaction avec la protéine chaperonne 14-3-3 qui le séquestre dans le cytoplasme, l'empêchant d'induire l'apoptose (Danial 2008).

– **Caspase 9** : Akt peut inhiber l'activité catalytique de la caspase 9 par phosphorylation mais elle ne phosphoryle pas d'autres caspases. Akt inhibe ainsi l'apoptose après la libération du cytochrome c en plus de ces rôles de prévention de la perméabilisation mitochondriale (Datta et al. 1999).

– **Les facteurs de transcription FOXO** (*Forkhead bOX protein O*) : La phosphorylation de ces facteurs de transcription entraîne la création d'un site d'interaction pour 14-3-3 et ainsi entraîne la séquestration de ces facteurs en dehors du noyau. Les FOXO ne peuvent alors plus activer la transcription de leurs gènes cibles codant pour des facteurs pro-apoptotiques tels que Bim (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) et FAS ligand (Ji Luo et al. 2003).

Akt peut également influencer la survie cellulaire de façon indirecte en régulant deux voies impliquées dans la survie :

– **NF- κ B** : NF- κ B entraîne la survie cellulaire en réponse à de nombreux signaux d'apoptose. En effet, c'est un facteur de transcription activant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la survie (voir paragraphe NF- κ B p 64). Akt exerce un effet positif sur la fonction de NF- κ B : elle phosphoryle et active la kinase IKK β qui a pour rôle d'entraîner la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B. Ainsi, en induisant la dégradation de cet inhibiteur, Akt libère NF- κ B permettant sa translocation au noyau où il active la transcription de ses gènes cibles (Vivanco & Sawyers 2002).

– **p53** : Akt influence l'activité de p53, un suppresseur de tumeur activé en réponse à des stress extracellulaires et qui a de multiples rôles pro-apoptotiques. L'expression de p53 et son activité sont régulées par la protéine Mdm2 (*Murine double minute 2*). Mdm2 est capable de fixer le domaine d'activation de la transcription de p53, d'inhiber le recrutement de facteurs activateurs et ainsi de réguler son expression. Elle bloque également son activité par interaction directe ; la liaison de Mdm2 à p53 entraîne la translocation de ce complexe du noyau au cytoplasme où Mdm2 adresse p53 au protéasome via son activité E3 ubiquitine ligase. La phosphorylation de Mdm2 par Akt favorise sa translocation au noyau et donc une inhibition accrue de p53 (Mayo & Donner 2001). Il s'agit d'une boucle de régulation négative puisque Mdm2 est induite par p53.

(iii) IMPLICATION DANS LA CROISSANCE : LA VOIE PI3K/AKT/MTOR

La voie de signalisation PI3K/Akt a de nombreuses ramifications entraînant son implication dans diverses fonctions. Certaines branches jouent un rôle prédominant dans la régulation de fonctions spécifiques, comme c'est le cas pour la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR impliquée dans la croissance cellulaire via la régulation du métabolisme et de la traduction.

La synthèse protéique est nécessaire à la croissance et à la prolifération et pour que cette synthèse puisse se faire les ressources doivent être suffisantes. Ainsi, les cellules ont des mécanismes de contrôle de la traduction sensibles, pour la plupart, aux nutriments disponibles, à l'énergie cellulaire, au stress, aux hormones et à la stimulation par les facteurs de croissance. L'étape limitante de la traduction est la phase d'initiation et la régulation se fait souvent à ce niveau (X. M. Ma & Blenis 2009). Elle nécessite l'intervention d'un complexe d'initiation de la traduction et notamment pour certains ARNm ayant une longue région non traduite en 5' (UTR) appelés ARNm « faibles ». En effet, les ARNm ne sont pas tous traduits avec la même efficacité ; ces ARNm « faibles » codant pour des protéines impliquées dans la survie telles que Mcl-1, c-Myc, Bcl-xl, survivine, cycline D... sont plus difficiles à traduire en raison de leur région UTR très structurée. Ils nécessitent une activité augmentée du complexe d'initiation de la traduction. L'augmentation de cette activité est observée fréquemment dans les cancers (Jerome Tamburini, Alexa S Green, Nicolas Chapuis, et al. 2009).

Le complexe mTORC1 régule directement la synthèse protéique chez les mammifères. Il est composé par **mTOR**, **Raptor** (*Regulatory-associated protein of mTOR*), **mLST8** (*mTOR associated protein, LST8 (lethal with Sec13 protein 8) homolog*), **PRAS40** (*Proline-Rich Akt-Substrate-40*) et enfin **DEPTOR** (*DEP-domain-containing mTOR interacting protein*) récemment identifié (Sophie Park et al. 2009, p.3). Son activation est régulée par les voies PI3K/Akt, Ras/ERK/p90RSK, TNF- α /IKK β , AMPK/GSK3 β , LKB1/AMPK et Wnt/GSK3 β .

La voie Akt/mTOR est initiée par la phosphorylation sur plusieurs sites de la TSC2 (Tuberous sclerosis 2, connu aussi sous le nom d'Hamartin) par Akt. Ces phosphorylations inhibent TSC2 par la création de sites d'interaction pour la protéine 14-3-3 (X. M. Ma & Blenis 2009). TSC2 est une GTPase qui fonctionne en association avec TSC1 (ou Tubérine) et inhibe la petite protéine G Rheb (*Ras homologue enriched in brain*) en le convertissant de la forme GTP-Rheb à la forme GDP-Rheb. La liaison à 14-3-3 empêche TSC2 d'interagir avec TSC1 et Rheb. Cela entraîne l'activation de Rheb qui se retrouve lié au GTP. Rheb active ensuite le complexe mTORC1 selon un mécanisme non encore élucidé (A M Martelli et al. 2011).

Akt peut également activer mTORC1 directement sans passer par TSC2 via la phosphorylation et l'inactivation de PRAS40 qui est un inhibiteur de mTORC1.

Une fois activé mTORC1 régule par phosphorylation certains composants de la machinerie de traduction cellulaire notamment **4E-BP1** et **p70S6 kinase**.

– **4E-BP1** (*Eukaryotic initiation factor 4E (eIF)-Binding Protein 1*) : Lors de l'initiation de la traduction, la partie 5' des ARNm contenant la coiffe (structure 7-méthyl-guanosine (m⁷G) non traduite) est recrutée au niveau de la petite sous-unité du ribosome. Ce recrutement

requiert l'assemblage du complexe eIF4F (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4F*) qui est composé de trois facteurs d'initiation : **eIF4E**, **eIF4G** et **eIF4A**. Pour assembler le complexe eIF4F, eIF4E lie la partie 5' de l'ARNm et recrute eIF4G et eIF4A. Le facteur 4E-BP1, lorsqu'il est non phosphorylé, lie eIF4E et empêche son interaction avec eIF4G et donc inhibe l'initiation de la traduction. Les voies de signalisation qui entraînent la phosphorylation de ce facteur 4E-BP1 induisent sa dissociation de eIF4E et autorise le recrutement de eIF4G et eIF4A (X. M. Ma & Blenis 2009) (figure 11).

Figure 11 : Pas d'autorisation de diffusion

– **P70S6K** (nommé également S6K) : Après son activation par mTOR, p70S6K phosphoryle nombre de substrats dont plusieurs contrôlent la production protéique :

- **rpS6** (*ribosomal protein S6*) : rpS6 fait partie de la sous-unité 40S du ribosome et est le substrat de p70S6K le plus étudié, toutefois les conséquences de sa phosphorylation par p70S6K ne sont pas encore claires. La phosphorylation de rpS6 par p70S6K a été impliquée dans la traduction d'ARNm particuliers appelés TOP ARNm (B. Magnuson et al. 2012). Ces ARNm constituent une famille de transcrits présents en grande quantité dans la cellule, qui codent des protéines ribosomales et des composants de l'appareil traductionnel. Ils sont nommés TOP ARNm car ils comportent une série de motifs pyrimidines (TOP : *Terminal OligoPyrimidine tract*) ARNm. La localisation de rpS6 à la frontière entre les sous-unités 40S et 60S du ribosome et donc son interaction potentielle avec les ARNm, les ARNt et les facteurs d'initiation était en faveur de cette hypothèse. De plus, la présence de facteurs de croissance ou d'acides aminés entraîne une efficacité accrue de la traduction des TOP ARNm et cette augmentation est associée à une phosphorylation de p70S6K et de rpS6 (B. Magnuson et al. 2012). Néanmoins, des études d'inactivation de p70S6K chez des souris n'ont montré aucun effet sur la traduction des TOP ARNm (Shima et al. 1998). De même, des cellules murines avec une protéine rpS6 non phosphorylable sur les sites normalement phosphorylés en réponse aux mitogènes n'ont pas montré de taux inférieur de traduction de TOP ARNm et au contraire de l'effet attendu, le taux global de la traduction est même augmenté (Ruvinsky et al. 2005).

La phosphorylation de rpS6 semble être impliquée dans le contrôle de la taille des cellules. Ainsi, de nombreux types cellulaires issus de souris rpS6^{-/-} ont une taille significativement plus faible que des cellules issues de souris normales et cette petite taille est accompagnée par une division accélérée. Il a donc été suggéré que la phosphorylation de rpS6 via mTOR aurait plutôt un rôle dans la croissance cellulaire plutôt qu'un rôle dans la traduction des TOP ARNm (Ruvinsky et al. 2005).

Cependant, l'inhibition de mTOR réduit fortement l'efficacité de traduction des TOP ARNm mais pas l'inhibition de Raptor ou de Rictor (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*, du complexe mTORC2) suggérant que mTOR régule bien la traduction des TOP ARNm mais indépendamment de mTORC1 ou mTORC2 (B. Magnuson et al. 2012).

- **eIF4B** (*eukaryotic Initiation Factor 4B*) : ce facteur d'initiation est recruté au niveau du complexe de pré-initiation de la traduction lorsqu'il est phosphorylé par

p70S6K. Il va alors augmenter l'activité hélicase de eIF4A qui catalyse la linéarisation des structures secondaires dans la région 5' non traduite des ARNm permettant la liaison initiale de la sous-unité 40S du ribosome et également la lecture en aval du codon initiateur (X. Ma & Blenis 2009) (figure 12).

Figure 12 : Pas d'autorisation de diffusion

- PDCD4 (*Programmed Cell Death protein 4*) : PDCD4 est un suppresseur de tumeur. Il lie l'hélicase eIF4A et également eIF4G. Il empêche ainsi la traduction soit en rentrant en compétition avec eIF4G pour la liaison de eIF4A soit en inhibant l'activité hélicase de ce dernier soit par les deux mécanismes. P70S6K est capable de phosphoryler PDCD4 et de l'adresser au protéasome pour dégradation (Dorrello et al. 2006).

Si P70S6K a été surtout décrit pour ses rôles dans la traduction, cette kinase a de nombreux autres substrats impliqués dans de nombreuses autres voies telles que la régulation du métabolisme, la synthèse lipidique et la différenciation adipocytaire mais aussi la survie cellulaire, la réponse aux dommages à l'ADN et la plasticité synaptique. Néanmoins, la compréhension de la signification fonctionnelle de la phosphorylation de la plupart de ces substrats reste limitée (B. Magnuson et al. 2012).

Concernant la survie cellulaire, p70S6K est capable de phosphoryler Bad et Mdm2, deux substrats d'Akt. P70S6K fait partie de la famille des sérine/thréonine kinases AGC qui inclut Akt, PKA, p90RSK... et ces kinases partagent une grande homologie notamment au niveau de leur domaine catalytique. Ainsi, les résidus nécessaires à la liaison des substrats d'Akt existent également dans p70S6K suggérant que certains substrats d'Akt pourraient être également substrats d'autres membres de la famille AGC. C'est le cas de Bad et de Mdm2 qui sont des substrats à la fois d'Akt (voir paragraphe voie PI3K/Akt, implication dans la survie et l'inhibition de l'apoptose p 54) et de p70S6K.

Par ailleurs, p70S6K est impliquée dans des boucles de régulations négatives. Elle inhibe IRS-1 (*insulin receptor substrate*) à la fois au niveau de son expression et au niveau de son activité en le phosphorylant sur plusieurs sérines inhibitrices. Cette phosphorylation induit une dégradation de IRS-1 par le protéasome. IRS-1 est une molécule adaptatrice permettant le transfert du signal entre les récepteurs à l'insuline (ou à l'IGF) et la voie de transduction PI3K/Akt. Sa dégradation induite par p70S6K empêche le couplage entre ces récepteurs avec PI3K et réduit l'activation des effecteurs en aval (B. Magnuson et al. 2012).

P70S6K influence également l'activation d'Akt par la phosphorylation de Rictor sur la Thréonine^{11, 35}. En effet, Rictor appartient au complexe mTORC2, un complexe qui va compléter l'activation d'Akt après l'action de PDK1 (Julien et al. 2010). Le mécanisme par lequel la phosphorylation de Rictor entraîne l'inhibition de l'axe mTORC2-Akt reste imprécis mais pourrait impliquer l'association de Rictor avec la protéine 14-3-3 (Treins et al. 2010). P70S6K est également capable de phosphoryler mTOR sur la sérine²⁴⁴⁸ et d'activer mTOR, une fonction qui était précédemment attribuée à Akt (Fenton & Gout 2011).

Ces boucles de régulation ont des implications importantes et doivent être prises en compte lorsque l'on essaye d'inhiber les voies en aval de mTORC1.

(iv) IMPLICATION DANS LA PROLIFERATION

En plus de ses rôles dans la croissance cellulaire, Akt a également un rôle important dans la prolifération cellulaire. Croissance et prolifération ont été longtemps utilisées comme des termes synonymes mais en 2000, Schmelzle et Hall ont défini la prolifération cellulaire comme une augmentation du nombre de cellules et la croissance comme une augmentation de la masse ou de la taille de la cellule via la synthèse de macromolécules (Schmelzle & M. N. Hall 2000).

Le cycle cellulaire est régulé par l'action coordonnée des complexes Cyclines/kinases dépendantes des cyclines (CDK) et des inhibiteurs de CDK. Les niveaux de cycline D1, cycline importante pour la transition G1/S, sont régulés au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel par des mécanismes distincts. Akt joue un rôle important dans la prévention de la dégradation de la cycline D1 en régulant l'activité de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*) une kinase qui phosphoryle la cycline D1 et l'adresse au protéasome pour dégradation : Akt phosphoryle directement GSK3 β , bloque son activité kinase et donc permet l'accumulation de cycline D1 (Vivanco & Sawyers 2002). Akt régule également l'activité de certains inhibiteurs de CDK tels que p27 et p21.

(b) DEREGLATIONS DANS LES LAM

La voie PI3K/Akt est très fréquemment activée dans les LAM et est nécessaire pour la prolifération et la survie des blastes (Billottet et al. 2006). La phosphorylation d'Akt sur la sérine⁴⁷³ peut être détectée dans 50% à 80% des cellules de patients atteints de LAM (Alberto M Martelli et al. 2010) (Sophie Park et al. 2009). L'activation constitutive de PI3K/Akt est observée dans 50% des échantillons de LAM de novo après privation de sérum et de cytokines (Jerome Tamburini et al. 2007). Le mécanisme de cette activation n'est pas défini ; l'activité de l'isoforme p110 δ de PI3K semble être la cause principale mais d'autres facteurs pourraient participer à cette activation : les mutations activatrices du récepteur FLT3 (*Fms-Like Tyrosine kinase 3*) et du récepteur c-Kit, des mutations dans N-RAS ou K-RAS, des surexpressions de l'isoforme p110 δ de PI3K, de faibles niveaux de PP2A et enfin la sécrétion autocrine ou paracrine de facteurs de croissance tels que IGF-1 (Alberto M Martelli et al. 2010).

–**Mutations FLT3** : Le récepteur FLT3 est un récepteur de type tyrosine kinase exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques normaux de la moelle osseuse et impliqué dans la prolifération, la survie et la différenciation via l'activation de plusieurs voies de signalisation telles que PI3K/Akt et Ras/MAPK. En effet, la partie cytoplasmique du récepteur FLT3 s'associe physiquement avec la sous-unité p85 de PI3K, avec Ras, avec la phospholipase C- γ , Shc (*src homology*), Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein*) et avec la famille Src (de sarcome) (S. Takahashi 2011b). Les mutations du gène FLT3 sont retrouvées chez approximativement un tiers des patients et font ainsi de FLT3 le gène le plus muté chez les patients atteints de LAM (voir paragraphe les mutations de type 1 p 29). En 2005, Brandts et ses collègues (C. H. Brandts et al. 2005) montrent que les mutations en tandem de FLT3 entraînent une activation constitutive d'Akt et cela sans addition de facteurs

de croissance. L'expression d'un dominant négatif d'Akt dans la cellule inhibe cette indépendance vis-à-vis des cytokines suggérant qu'Akt est nécessaire pour l'activation des voies FLT3. Les mutations du récepteur FLT3 activent également la voie STAT ce qui n'est pas le cas du récepteur non muté.

Cependant, il semblerait que les différentes mutations FLT3-ITD et FLT3-TKD n'induisent pas les mêmes voies en aval. En effet, les souris transgéniques exprimant FLT3-ITD développent une maladie myéloproliférative et les souris FLT3-TKD un désordre lymphoïde (A Renneville et al. 2008).

– **Mutations du récepteur c-Kit** : c-kit est un récepteur transmembranaire activé par SCF (*Stem Cell Factor*) qui est fréquemment muté dans les LAM (voir paragraphe les mutation de type 1, p 29). Les voies en aval de ce récepteur étant les voies PI3K/Akt et MAPK, l'activation constitutive de ces voies par des mutations activatrices de ce récepteur a été envisagée.

– **Mutations N-Ras et K-Ras** : Des mutations ponctuelles des gènes RAS sont retrouvées dans 20%-30% des LAM ; il s'agit surtout de mutations concernant N-RAS mais des mutations dans K-RAS existent également. Ces mutations activent principalement la voie MAPK mais peuvent aussi activer la voie PI3K/Akt notamment dans les LAM (Birkenkamp et al. 2004).

Toutefois, ces mutations ne peuvent pas à elles seules expliquer l'activation de la voie PI3K/Akt puisque l'activation spontanée de PI3K est plus fréquente que les mutations FLT3, Ras et c-Kit (P Cornillet-Lefebvre et al. 2006).

– **Surexpressions des isoformes p110δ de PI3K** : Les PI3K sont réparties en trois classes selon leur préférence de substrats et leurs homologies de séquence. La classe I de PI3K génère du PIP3 à partir du PIP2 et est responsable de l'activation d'Akt dans les cellules (Sujobert et al. 2005). Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85. Les sous-unités régulatrices sont codées par trois gènes, il existe trois isoformes : p85α, p85β et p85γ. Elles ont toutes une structure commune : un site de liaison à la sous-unité catalytique p110 et deux domaines SH2 (*Src-Homology domains*). Ces domaines SH2 permettent l'interaction avec les tyrosines phosphorylées du récepteur RTK en amont ou avec des molécules adaptatrices telle que IRS-1. La sous-unité p110 est codée par trois gènes donnant trois isoformes p110α, p110β et p110δ (Engelman et al. 2006). La classe IB n'a pas de sous-unité p85, mais une sous-unité régulatrice p110 qui interagit avec une sous-unité catalytique p110γ, et n'est donc pas activée par les RTK ; elle est activée uniquement en interagissant avec la sous-unité βγ des protéines G (Engelman et al. 2006). Les isoformes p110α et β sont présentes dans une large variété de tissus alors que les isoformes p110δ et γ sont exprimés majoritairement dans les cellules sanguines (Sujobert et al. 2005). Ces isoformes semblent avoir des fonctions distinctes à la fois dans les processus normaux et pathophysiologiques. Ainsi, l'isoforme p110α apparaît mutée de façon spécifique dans certains cancers tandis que l'isoforme p110β joue un rôle important dans l'activation des plaquettes (Billottet et al. 2006). L'isoforme p110δ semble avoir un rôle essentiel dans l'activation de la voie PI3K/Akt dans les LAM. En effet, il a été

montré que l'isoforme p110δ a un haut niveau d'expression dans des cellules LAM ayant une activation constitutive de PI3K alors que les autres isoformes ont une expression plus variable dans ces mêmes cellules. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette isoforme diminue l'activation d'Akt et inhibe la prolifération de ces cellules (Sujobert et al. 2005) (Billottet et al. 2006).

–**PP2A** : La phosphatase 2A (PP2A) est une phosphatase exprimée de façon ubiquitaire, et est une des phosphatases majeures dans les cellules eucaryotes ; elle participe à de nombreuses voies de signalisation. Dans les LAM, il a été montré que l'intensité de phosphorylation de Akt sur la threonine 308 est associée à une activité PP2A moindre (N Gally et al. 2009). Récemment, il a été décrit qu'une activité réduite de PP2A est une caractéristique commune des cellules LAM et que la restauration de son activité augmente la phosphorylation d'Akt et affecte la prolifération (Cristóbal et al. 2011).

–**Signalisation autocrine IGF-1/IGF-1R** : Le récepteur IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor receptor I*) est un récepteur tyrosine kinase largement exprimé dans les tissus et qui est très homologue au récepteur à l'insuline. Son activation est entraînée par la liaison d'IGF (Insulin-like growth factor). Il a été impliqué dans le développement et la progression de plusieurs types de cancers. Dans les LAM, la production autocrine de IGF-1 est décrite ainsi que l'activation de la voie PI3K/Akt et la croissance des blastes en réponse à l'activation de IGF-1R par IGF-1 (Doepfner et al. 2007). Une autre étude montre que cette stimulation autocrine est en partie responsable de l'activité constitutive de la voie PI3K/Akt, les échantillons de patients ayant une activation constitutive de cette voie ont également une activation constitutive de IGF-1/IGF-1R. De plus, les auteurs observent une inhibition de PI3K dans 70% de ces échantillons lorsqu'ils utilisent des anticorps anti-IGF-1R, corrélée à une diminution de la capacité proliférative (Nicolas Chapuis et al. 2010).

La voie de signalisation mTORC1 est aussi activée dans les LAM. S.Park et ses collègues rapportent une activation de p70S6K dans la majorité des échantillons LAM testés et une activation de 4E-BP1 dans tous les échantillons (Sophie Park et al. 2009). Les mécanismes d'activation restent largement inconnus mais semblent être indépendants de l'activation de PI3K puisque l'utilisation d'inhibiteur de p110δ affecte la phosphorylation d'Akt sans affecter celle de mTORC1 (Sophie Park et al. 2009).

De plus, d'autres dérégulations de cette voie sont observées dans les LAM :

– **eIF4E** : eIF4E est un facteur d'initiation de la traduction ; son activation entraîne une croissance cellulaire et éventuellement une transformation lorsqu'il est surexprimé (Topisirovic et al. 2003). Cette capacité de transformation semble liée à la dérégulation de la traduction de certains ARNm importants pour la croissance. Ce facteur est surexprimé dans les LAM M4/M5 et pourrait avoir un rôle dans la leucémogenèse à la fois en augmentant la synthèse protéique et dans le transport d'ARNm spécifiques, tels que la cycline D1, du noyau au cytoplasme (Topisirovic et al. 2003).

– **4E-BP1** : Le traitement des cellules LAM par des inhibiteurs de mTORC1 entraîne une déphosphorylation de p70S6K mais pas de 4E-BP1. L'insensibilité de 4E-BP1 est expliquée par une indépendance de ce facteur vis-à-vis de mTORC1 et une dépendance vis-à-vis d'une kinase nommée PIM-2 (*Provirus Integration site for Moloney murine leukaemia virus*); qui n'est pas régulée par PI3K (Jerome Tamburini, Alexa S Green, Valerie Bardet, et al. 2009) (figure 13).

Figure 13 : Pas d'autorisation de diffusion

La dérégulation de la synthèse protéique joue un rôle important dans les cancers et fait partie du processus de transformation. Dans les LAM il existe un mécanisme indépendant de mTORC1 régissant la régulation du complexe d'initiation de la traduction. Cela semble indiquer que les LAM ont une dépendance à l'activation de la traduction et fait de cette dernière une cible potentielle pour des traitements (Carroll 2009).

(2) RAS/ MAP KINASES

(a) BIOLOGIE GENERALE DE LA VOIE RAS/MAP KINASES

La voie des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein kinases*) est un autre système important dans l'intégration des stimuli extérieurs, leur transduction dans la cellule et la mise en place de réponses appropriées telles que la prolifération, la différenciation et la survie. La cascade des MAP kinases est une voie de signalisation impliquant de nombreuses protéines telles que des kinases, des phosphatases, des protéines adaptatrices, des GTPases... La stimulation de récepteurs tyrosine kinase, couplés à cette voie par leur ligand induit leur dimérisation et leur autophosphorylation sur des résidus tyrosine. Cela crée des sites de liaison pour des protéines adaptatrices telle que Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) et le recrutement de la protéine SOS (*Son Of Sevenless*) à la membrane plasmique. SOS va activer Ras, qui est lié à la membrane, en catalysant l'échange GDP en GTP. Lorsqu'il est lié au GTP, Ras peut se combiner avec Raf. Raf a un rôle de MAP kinase kinase et va activer MEK1/2 par phosphorylation. La cascade de phosphorylation continue avec les kinases ERK1/2 qui, une fois phosphorylées, peuvent activer un grand nombre de substrats cytoplasmiques et nucléaires (Santarpia et al. 2012). Ras se situe à la convergence de multiples voies de signalisation : son activation passe principalement par l'activation des récepteurs tyrosine kinase mais également par d'autres types de récepteurs tels que des RCPG (Récepteurs Couplés aux Protéines G) (Wellbrock et al. 2004). Ceci entraîne la cascade des MAPK majoritairement mais peut également activer la voie PI3K/Akt, la voie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), la voie p38MAPK...

Figure 14 : Pas d'autorisation de diffusion

Ainsi la voie RAS/MAPK régule de nombreuses voies et partage des substrats avec la voie PI3K/Akt :

–**Régulation de l'apoptose** : La voie RAS/MAPK régule l'activité de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose. ERK phosphoryle des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la transcription de membres de la famille Bcl-2 et d'autres gènes important dans l'apoptose. ERK est également capable de phosphoryler directement certaines molécules pro-apoptotiques telles que Bcl-2, Mcl-1, Bad, Bim... Ce dernier est une molécule clé de la cascade des MAPK. L'activité de Bim est régulée par phosphorylation sur différents sites par ERK mais également par Akt. Lorsqu'il est phosphorylé, Bim est adressé au protéasome pour y être dégradé, ainsi il ne peut plus interagir avec Bax : il y a inhibition de l'apoptose (Steelman et al. 2011).

ERK est également capable de phosphoryler p90RSK. Cette kinase peut phosphoryler Bad sur la sérine 112, et inhiber sa fonction pro-apoptotique, et activer le facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) impliqué dans la survie cellulaire (Mebratu & Tesfaiqi 2009).

– **Régulation de l'initiation de la traduction** : La phosphorylation de p90RSK entraîne la phosphorylation de rpS6 et eIF4B comme p70S6K dans la voie PI3K/Akt/mTOR.

–**Régulation de la prolifération** : ERK, une fois activée, transloque dans le noyau où elle va rencontrer ses cibles telles que Elk-1 (*E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*), un facteur de transcription dont l'activation augmente la transcription de protéines impliquées dans la croissance comme c-Fos (Mebratu & Tesfaiqi 2009, p.2). Son action sur les facteurs de transcription de la famille FOXO entraîne la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

(b) DEREGULATIONS DANS LES LAM

La voie RAS/MAPK régule des fonctions clés dans la cellule et des altérations sont observées dans de nombreux cancers. Concernant les LAM, la voie MAPK est constitutivement activée dans la majorité des populations leucémiques (Towatari et al. 1997) et son inhibition entraîne une apoptose des blastes LAM (P. Lunghi et al. 2003). Cette activation est due à différents facteurs pour la plupart impliqués également dans l'activation de la voie PI3K/Akt : mutations des récepteurs FLT3, Kit, des mutations RAS...

(3) JAK/STAT

(a) BIOLOGIE GENERALE DE LA VOIE JAK/STAT

La famille de protéine JAK est composée de 4 tyrosines kinases cytoplasmiques chez les mammifères : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces protéines JAK sont recrutées et activées par

des récepteurs membranaires aux cytokines tels que les récepteurs à GM-CSF, IL-3, IL-6, érythropoïétine, aux interférons... Elles jouent ainsi un rôle important dans l'hématopoïèse normale et pathologique. Lorsqu'elles sont activées, les JAKs phosphorylent des activateurs de la transcription nommés STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, famille composée de 7 membres : STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5A, STAT-5B et STAT-6) induisant leur changement de conformation, leur dimérisation en homodimères ou hétérodimères et leur translocation au noyau où ils peuvent modifier l'expression de certains gènes. Cette voie de signalisation joue un rôle critique dans la prolifération et la résistance à l'apoptose médiées par de multiples cytokines (Steensma et al. 2006).

(b) DEREGLATIONS DANS LES LAM

Des phosphorylations activatrices de STAT3 et STAT5 sont observées dans plusieurs lignées cellulaires et dans une large proportion d'échantillons LAM (de 44% à 76% des échantillons selon les études) (Steensma et al. 2006). Cette activation aberrante pourrait participer à la résistance à l'apoptose, à l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et à la prolifération accrue caractérisant les LAM (Steensma et al. 2006). Cependant, les mécanismes d'activation de cette voie restent inconnus.

Des mutations de JAK2 sont décrites dans les maladies myéloprolifératives où elles sont relativement fréquentes notamment dans la maladie de Vaquez (ou polyglobulie primitive) dans laquelle la majorité des échantillons ont une mutation faux sens dans le domaine kinase : V617F (J. W. Lee et al. 2006, p.2). Dans les LAM, les mutations JAK2 V617F sont extrêmement rares (2% à 8% des échantillons testés)(J. W. Lee et al. 2006) (Schnittger et al. 2007) et ne peuvent expliquer l'activation de STAT retrouvée chez une grande partie des patients. Récemment, il a été observé que la phosphorylation de JAK est une caractéristique majeure des LAM : dans leur étude Ikezoe et collègues montrent que sur 77 échantillons testés tous sont positifs pour la phosphorylation de JAK, certains (31 patients) à un haut niveau et d'autres (46 patients) à un niveau plus faible (Ikezoe et al. 2011, p.-). Cette activation de JAK pourrait être due à des mutations dans des molécules de co-stimulation ; ainsi les mutations du récepteur FLT3 peuvent entraîner une activation des voies de signalisation en aval telles que JAK/STAT 5 (Daver & Cortes 2012). Au contraire, dans l'étude de Ikezoe seulement 3 des patients présentent une mutation FLT3-ITD et un seul une mutation JAK2. Ces mutations ne peuvent donc pas expliquer l'activation JAK/STAT chez la majorité des patients et impliquent l'intervention d'autres mécanismes. Ces auteurs suggèrent qu'une boucle d'auto-activation via la production autocrine ou paracrine de cytokines pourrait activer constitutivement la voie JAK/STAT, sachant que la sécrétion aberrante d'IL-6 est observée dans les LAM et que les cellules concernées par cette sécrétion ont une activation constitutive de STAT3 (Ikezoe et al. 2011).

La famille NF- κ B est une famille de facteurs de transcription ayant un rôle central dans la protection de l'intégrité des organismes multicellulaire. NF- κ B joue un rôle clé dans la défense contre les infections via l'induction de l'immunité innée et adaptative mais peut aussi protéger l'organisme contre d'autres dangers tels que des molécules chimiques dangereuses, des radiations...(Baltimore 2011) Sa biologie est très complexe : son activation est très finement régulée, médiée par des stimuli variés et en interaction avec de multiples voies de signalisation. Ces stimuli peuvent reconnaître un récepteur à la surface de la cellule ou à l'intérieur de la cellule pour initier une voie de transduction. Cela peut être des cytokines pro-inflammatoires, du TNF- α , de l'interleukine-1 (IL-1) pour l'activation des macrophages ou des fibroblastes ; des antigènes pour les lymphocytes T et B ; du glutamate pour les cellules nerveuses ; des agents chimiques ou des radiations qui induisent un dommage à l'ADN... Ces stimuli induisent des voies différentes, encore mal définies. Toutefois, elles impliquent toutes des kinases, des ubiquitinations et des complexes protéiques appelés IKK, pour I κ B Kinase, I κ B α étant l'inhibiteur des membres de la famille NF- κ B (Baltimore 2011).

La famille NF- κ B est constituée de cinq membres chez les mammifères : RelA (p65), RelB, Rel (cRel), NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- κ B2 (p52 et son précurseur p100) (Baud & Karin 2009). Ces protéines forment des hétérodimères et des homodimères et leur activité est régulée par deux voies principales : la voie canonique et la voie non canonique. Dans les deux cas, les dimères NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme par des protéines de la famille I κ B α . Les stimulations activatrices entraînent la dégradation de ces protéines I κ B α via leur phosphorylation et leur subséquent adressage au protéasome et ainsi permettent la libération de dimères NF- κ B qui peuvent alors transloquer au noyau et activer leurs gènes cibles (Oeckinghaus et al. 2011).

– **La voie classique ou canonique** : Elle concerne généralement les hétérodimères Rel A-p50 et est induite par de nombreux stimuli tels que TNF- α , IL-1, des virus, des agents génotoxiques... Dans le cas d'une stimulation par le TNF α par exemple, la liaison au TNF-R1 entraîne la liaison de TRADD, la formation d'une plateforme de recrutement de différentes molécules qui entraîne l'activation du complexe IKK. Le complexe IKK est composé de deux kinases IKK α et IKK β , ayant une activité catalytique et de IKK γ (nommé aussi NEMO, *NF- κ B Essential MOdulator*) qui est la sous-unité régulatrice. Il phosphoryle les molécules I κ B α qui sont alors ubiquitinées puis dégradées par le protéasome ; les dimères NF- κ B peuvent alors migrer au noyau et activer la transcription de leurs gènes cibles (Oeckinghaus et al. 2011). La voie canonique est impliquée dans le contrôle de l'immunité innée et de l'inflammation (Baud & Karin 2009).

– **La voie alternative ou non canonique** : Cette voie est induite par un panel de cytokines plus restreint que dans le cas de la voie canonique : il s'agit de cytokines qui appartiennent à la superfamille TNF telles que BAFF (*B-cell-activating factor*), LT β

(LymphoToxine β) et le ligand de CD40. Elle implique une kinase en amont appelée NIK (*NF- κ B-Inducing Kinase*) qui active IKK α , qui à son tour active l'hétérodimère RelB-p100 en phosphorylant et adressant au protéasome p100, qui inhibe RelB, pour qu'il soit partiellement dégradé. Cela entraîne la formation de p52-RelB et p50-RelB qui transloquent au noyau et activent la transcription de plusieurs gènes. Cette voie est impliquée dans le contrôle du développement, l'organisation et le fonctionnement des organes lymphoïdes secondaires et de la maturation des cellules B et leur survie (Baud & Karin 2009).

Figure 15: Pas d'autorisation de diffusion

L'activation de la famille NF- κ B entraîne la transcription d'un large panel de gènes et l'échappement de cette voie à toute régulation entraîne des pathologies telles que des cancers.

(b) DEREGULATIONS DANS LES LAM

La voie NF- κ B est souvent dérégulée dans les cancers, à la fois dans les tumeurs solides et hématologiques. A travers l'activation de la transcription de multiples gènes, l'activation de NF- κ B entraîne la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la métastase, l'inflammation et la suppression de l'apoptose et ainsi peut affecter chacune des six altérations caractéristiques des cancers (figure 16). Dans certains cancers, la dérégulation de la voie NF- κ B est due à la réponse inflammatoire de l'environnement et dans d'autres à des mutations dans des gènes régulant cette voie.

Figure 16 : Pas d'autorisation de diffusion

Dans les LAM, l'activation de la voie NF- κ B semble avoir un rôle important :

- **Elle est observée dans les cellules leucémiques d'un grand nombre de patients**, à la fois dans les blastes et dans les cellules souches leucémiques. En effet, en 2001 Guzman et collègues observent que les cellules progénitrices normales CD34⁺ non stimulées n'expriment pas NF- κ B alors que les cellules progénitrices CD34⁺ des LAM montrent une activité NF- κ B aberrantes. Cette observation est également faite dans les cellules souches leucémiques (M L Guzman et al. 2001). En 2004, Buesco-Ramos observe la translocation nucléaire des sous-unités p65 et p50 actives et ainsi une activité NF- κ B dans 14 prélèvements de patients sur 30 testés (C. E. Buesco-Ramos et al. 2004). Cependant, l'activation de NF- κ B n'est pas uniforme parmi les patients ; Cillioni et collègues observent que 40% des échantillons testés ont une activité NF- κ B déterminée par la quantification du complexe NF- κ B-ADN (Cilloni et al. 2007).

- **Elle est associée à la survie des cellules** et probablement à leur prolifération. En 2004, Birkenkamp et son équipe ont montré que les échantillons LAM avec une activité constitutive de NF- κ B lié à l'ADN ont un pourcentage d'apoptose plus faible en culture que

ceux qui n'ont pas d'activité constitutive. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de l'import de NF- κ B entraîne une sensibilité accrue au traitement par un inhibiteur de la topoisomérase II (Birkenkamp et al. 2004). De même, l'étude de Frelin en 2005, rapporte que l'utilisation d'un inhibiteur de la kinase IKK β bloque l'activation constitutive de NF- κ B et entraîne l'apoptose des cellules LAM (Frelin et al. 2005). Cette inhibition de NF- κ B potentialise l'effet d'autres molécules telles que l'étoposide, la dauxorubicine et la cytarabine (Frelin et al. 2005). Les cellules LAM semblent donc avoir une certaine dépendance vis-à-vis de la voie NF- κ B pour leur survie.

Cette étude montre également que l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules de patients est corrélée au nombre de blastes dans le sang circulant (Frelin et al. 2005). En accord avec cette observation, chez des patients dont les cellules leucémiques ont une activité NF- κ B, le taux de globules blancs est augmenté au diagnostic et un taux de blastes plus important est observé dans la moelle osseuse par rapport aux patients dont les cellules n'ont pas d'activité NF- κ B détectable. Cela suggère un lien entre activité NF- κ B et prolifération. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'expression de la cycline D1, qui est sous le contrôle de NF- κ B, pourrait être responsable de cette corrélation. L'expression augmentée de facteurs de croissance tels que GM-CSF ou G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) a été aussi incriminée, ces facteurs étant eux aussi dépendant de l'activité NF- κ B (Cilloni et al. 2007). Au contraire, l'étude de Buesco-Ramos ne montre aucune corrélation entre la prolifération cellulaire et l'activité NF- κ B (C. E. Buesco-Ramos et al. 2004).

– **L'inhibition de NF- κ B dans les cellules souches LAM** diminue leur capacité à donner naissance à une tumeur chez des souris immunodéficientes (Breccia & Alimena 2010).

Néanmoins, le mécanisme moléculaire de l'activation de la voie NF- κ B reste à détailler. L'activation du complexe NF- κ B par la dérégulation de la signalisation IKK a été décrite dans les cellules souches leucémiques et les blastes LAM. Une activité importante du complexe IKK entraîne l'activation de NF- κ B mais cette activation est indépendante de l'expression d'I κ B α (B. Baumgartner et al. 2002).

Il existe différentes hypothèses pour l'activation du complexe IKK :

– **Activation de FLT3** : l'activation de FLT3 peut entraîner l'activation de NF- κ B (S. Takahashi et al. 2005) : Grosjean-Raillard et son équipe ont montré que l'activation constitutive de FLT3 pourrait être responsable de l'activation constitutive de NF- κ B dans les LAM. Ils observent que IKK β interagit avec FLT3 lorsque celui-ci est actif et que cela entraîne l'activation de IKK β puis l'activation de NF- κ B. De plus, l'inhibition de FLT3 réduit fortement la phosphorylation activatrice de IKK β , dissocie le complexe FLT3/IKK β , inhibe NF- κ B et entraîne l'apoptose des cellules (Jennifer Grosjean-Raillard et al. 2008). Cette observation est en contradiction avec l'étude de l'équipe de Birkenkamp et al. ; les auteurs observent une activation constitutive de NF- κ B dans 9 des 12 échantillons activés constitutivement pour FLT3 mais ils n'observent pas d'effets de l'inhibition de FLT3 sur l'activité NF- κ B (Birkenkamp et al. 2004).

– **Activation d'ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) : des cellules soumises à un agent génotoxique peuvent déclencher une voie de signalisation permettant la détection des dommages à l'ADN, l'activation des mécanismes de réparation, la régulation du cycle cellulaire... Dans le cas de coupures doubles brins, la voie mise en jeu implique ATM, une kinase nucléaire, et mène à l'activation de NF- κ B. NEMO, la sous-unité régulatrice de IKK, est essentielle dans cette voie ; elle forme un complexe stable avec ATM activé dans le noyau et est exporté dans le cytoplasme où il peut activer le complexe IKK (S. Miyamoto 2011). ATM pourrait être responsable de l'activation constitutive de NF- κ B dans les LAM. En effet, l'analyse d'échantillons LAM et de modèles de lignées cellulaires a montré que l'activation d'ATM est constitutive dans une partie des échantillons testés ; une activation constitutive de NF- κ B est alors observée. Cette activation est due à l'interaction de la kinase ATM avec NEMO entraînant l'activation du complexe IKK. Lorsque ATM est inhibée, l'interaction avec NEMO est perdue, le complexe IKK est désactivé et les cellules entrent en apoptose (J Grosjean-Raillard et al. 2009). Cependant, les auteurs de cette étude notent que sur leurs trois lignées constitutivement actives pour NF- κ B, une seule est constitutivement active pour ATM et répond aux inhibiteurs d'ATM. Les deux autres lignées montrent une phosphorylation constitutive de FLT3 au contraire de la lignée sensible aux inhibiteurs ATM. Les auteurs proposent alors que les différentes populations de cellules malignes utilisent des mécanismes différents pour l'activation de la voie NF- κ B (J Grosjean-Raillard et al. 2009).

– **Interleukine-1 β** : une autre hypothèse pour la sur-activation de NF- κ B dans les LAM est une boucle d'amplification via l'expression de l'interleukine-1 β : NF- κ B stimule l'expression d'IL-1 β qui à son tour stimule l'activation de NF- κ B. Une étude sur le resvératrol a montré que celui-ci est capable de bloquer la production d'IL-1 β entraînant l'inhibition de NF- κ B et l'apoptose des cellules LAM (Zeev Estrov et al. 2003). L'étude de Birkenkamp et al. n'est pas en accord avec cette hypothèse ; l'incubation de cellules sensibles à IL-1, IL-6, TNF α et GM-CSF avec le surnageant de culture de cellules LAM n'entraîne pas d'activation de NF- κ B. De même, l'utilisation d'anticorps anti-IL-1, anti-IL6, anti-TNF α et anti-GM-CSF pour la culture des cellules LAM n'entraîne pas d'inhibition de l'activité constitutive de NF- κ B (Birkenkamp et al. 2004).

– **Activation via la voie Ras/PI3K/Akt** : au vu des nombreuses interactions de la voie NF- κ B avec d'autres voies activées dans les LAM telles que PI3K/Akt, il est possible que l'activation de NF- κ B puisse se faire via l'activation de ces voies. Dans l'étude de Birkenkamp, 73% des échantillons de LAM sont constitutivement activés pour NF- κ B et pour 68% d'entre eux cette activation est corrélée à une activation de RAS. Les auteurs observent également que cette activation de NF- κ B par RAS passe par la voie PI3K/Akt : l'activation de RAS est associée à l'activation de Akt dans un grand nombre de cas, l'utilisation d'un inhibiteur de RAS inhibe l'activation d'Akt ainsi que l'activation de NF- κ B et l'inhibition d'Akt inhibe l'activation de NF- κ B. Les auteurs concluent donc que la voie RAS/PI3K/Akt pourrait être responsable de l'activité constitutive de NF- κ B dans les LAM (Birkenkamp et al. 2004).

L'identification des anomalies génétiques dans les LAM et des dérégulations des voies de signalisation qui en découlent, a permis le développement de thérapies dirigées contre ces dérégulations. Le chapitre suivant détaille les thérapies ciblées envisagées aujourd'hui pour le traitement des LAM après un paragraphe sur les traitements conventionnels utilisés pour le traitement des patients dans la majorité des cas.

LES TRAITEMENTS INNOVANTS : LES THERAPIES CIBLEES

Le traitement des LAM représente un challenge à cause des rechutes et des complications associées aux traitements. Les chimiothérapies standards ont des effets secondaires, notamment sur les personnes âgées et il est important de développer de nouvelles thérapies pour pallier ces difficultés. Des thérapies ciblées sont en cours d'étude basées sur les récents avancements dans la connaissance de la biologie de la maladie.

Un exemple de réussite de thérapie ciblée est le traitement des leucémies promyélocytaires par l'ATRA. Cette leucémie correspond au sous-type LAM 3 de la classification FAB et est caractérisée par une translocation équilibrée entre les chromosomes 15 et 17 qui entraîne une fusion entre le gène PML et RAR α (un facteur de transcription fixant l'acide rétinoïque). La protéine de fusion PML/RAR α en résultant inhibe la transcription des gènes cibles de RAR α qui sont impliqués dans la différenciation granulocytaire (Kamimura et al. 2011) (voir paragraphe aberrations chromosomiques p 30). Ce type de leucémie représente une urgence médicale à cause des risques hémorragiques. L'introduction de l'ATRA en 1987 a radicalement changé le pronostic de cette leucémie ; en effet l'administration de hautes concentrations d'ATRA permet le retour à une fonction normale de RAR α et ainsi à une différenciation cellulaire. Les taux de rémissions complètes après un traitement optimisé à l'ATRA sont aujourd'hui de 90% à 95% (Z.-Y. Wang & Z. Chen 2008).

L'identification des anomalies moléculaires dans les différents sous-types de LAM laisse espérer la découverte de nouvelles thérapies ciblant ces anomalies et entraînant des taux de rémission aussi significatifs.

3. CIBLER LES ANTIGENES DE SURFACE : LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux émergent en tant que thérapie ciblée efficace dans les cancers humains. Ils sont utilisés dans plusieurs cancers :

- Le Rituximab (MabThera®), un anti-CD20 est commercialisé par Roche pour le traitement des lymphomes diffus à grandes cellules B en association avec la cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone (Cartron & Rossi 2009).
- Le Trastuzumab (Herceptin®, Roche) dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur HER 2 pour le traitement des cancers du sein HER2 positifs.
- Le Cetuximab (Erbix®) dirigé contre EGFR pour le traitement du cancer colorectal métastatique et les carcinomes de la tête et du cou. Il est développé par MERCK.

Ces anticorps ont différents modes d'action : ils induisent une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (fixation des macrophages et cellules natural killer (NK) sur la partie Fc de l'anticorps et induction de la lyse cellulaire), une cytoxicité cellulaire dépendante du complément (activation du complément via le fragment Fc, activité régulée par les protéines inhibitrices du complément telles que CD46, CD35, CD55 et CD59), l'inhibition

d'un signal de transduction ou l'induction directe de l'apoptose (R Majeti 2011). Dans certains cas, un anticorps induit plusieurs de ces mécanismes simultanément.

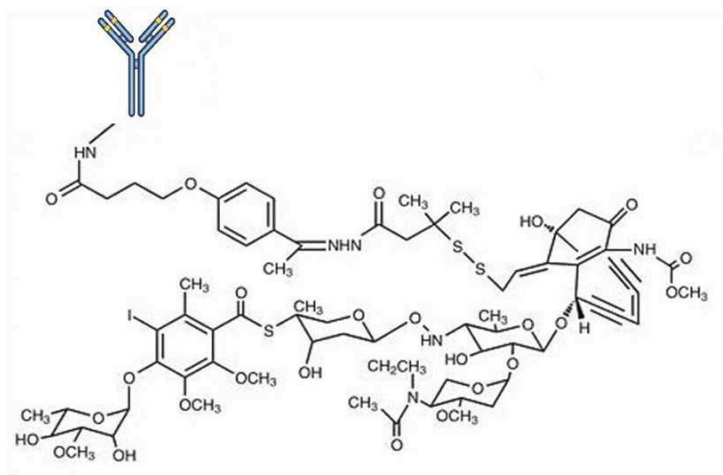
Ces thérapies ont comme avantage d'être ciblées dans l'organisme. Elles peuvent être conjuguées à une molécule chimiothérapeutique ou à un radioisotope et ainsi adresser ces molécules directement aux cellules ciblées avec pour conséquence une réduction des toxicités.

a) ANTICORPS MONOCLONAL EN ESSAI CLINIQUE : LES ANTI-CD33

Le CD33 est une glycoprotéine de surface exprimée à la surface de cellules myéloïdes, progénitrices (de façon importante) et matures (à une faible densité), et chez une large majorité des blastes de patients atteints de LAM. Le CD33 est le plus petit membre de la famille siglec (*sialic acid-binding Ig-related lectins*) et est impliqué dans les interactions cellule-cellule et dans l'adhérence cellulaire des cellules myéloïdes à la matrice extracellulaire à certains stades de leur différenciation (Ball & Broome 2010). Au vu de sa présence augmentée sur les blastes LAM et son manque d'expression dans les tissus non hématopoïétiques, des anticorps dirigés contre CD33 ont été développés pour traiter les patients atteints de LAM.

(1) GEMTUZUMAB-OZOGAMICIN

L'anticorps anti-CD33 le mieux décrit est le Mylotarg® ou gemtuzumab-ozogamicin (GO), un anticorps humanisé lié à une toxine : la calichéamicine. Il est développé par Pfizer.



–Les études précliniques :

Des études in vitro ont montré que le GO est rapidement internalisé après liaison avec le CD33 et la calicheamicine est relarguée de l'anticorps par hydrolyse. Elle entraîne des cassures double brin en se liant au petit sillon de la double hélice de l'ADN. Ainsi, GO entraîne un arrêt en G2/M et une induction d'apoptose (Breccia & Lo-Coco 2011). Dans les

lignées et les cultures primaires de cellules de LAM, le GO entraîne l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, la perméabilisation mitochondriale et l'activation de protéine kinase p38MAPK (Haag et al. 2009).

– **Les études cliniques :**

Dans des études cliniques, le GO a montré une activité significative chez des patients âgés en rechute avec approximativement 30% de réponse et ceci a accéléré son autorisation de mise sur le marché en 2000 (Foran 2012). Une série d'études cliniques de phase III de confirmation a été menée avec le GO soit en combinaison avec une chimiothérapie d'induction soit en consolidation. Malheureusement, malgré les bénéfices importants au niveau du taux de réponses et de la survie (notamment pour les patients avec cytogénétique favorable ou intermédiaire), des toxicités hépatiques et hématologiques ont été observées et en 2010 le Mylotarg® est retiré spontanément du marché par Pfizer (Foran 2012). Cependant, des tests cliniques sont en cours pour essayer d'adapter la posologie afin de réduire les toxicités. Récemment, un test clinique français dont les résultats viennent d'être publiés dans « The lancet » montre un avantage au niveau de la survie des patients traités avec le GO. Les patients étaient traités par chimiothérapie standard (daunorubicine et cytarabine) et le GO ajouté en faible dose ; de cette façon les toxicités hépatiques et hématologiques sont très réduites (Castaigne et al. 2012).

(2) LINTUZUMAB

Le lintuzumab, développé par Seattle genetics, (appelé aussi SGN-33 ou HuM195) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre CD33 mais non conjugué.

– **Les études précliniques :**

Les études in vitro ont montré que le lintuzumab entraînait une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules LAM, une induction de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et la phagocytose des cellules LAM. Les études de xénogreffe ont montré une diminution de la taille de la tumeur et une augmentation de la survie des animaux greffés (M. K. Sutherland et al. 2009).

– **Les études cliniques :**

Les essais cliniques ont apporté des conclusions différentes. Des études de phase II avaient montré que le lintuzumab utilisé seul avait une efficacité faible mais observable chez les patients avec une LAM à faible risque laissant espérer que cet anticorps serait efficace en combinaison avec une chimiothérapie. Malheureusement, l'étude de phase III évaluant l'efficacité du lintuzumab en combinaison avec une chimiothérapie versus chimiothérapie seule pour le traitement de patients avec des LAM réfractaires ou en rechute a donné des résultats décevants. Le lintuzumab n'entraîne pas de toxicité mais n'entraîne pas non plus

d'amélioration statistiquement pertinente entre le groupe traité et non traité (36% de rémission totale et partielle dans le groupe traité par lintuzumab et chimiothérapie et 28% chez les patients traités par la chimiothérapie uniquement) (E. J. Feldman et al. 2005). Néanmoins, un essai clinique de phase I avec des doses plus élevées et plus fréquentes de lintuzumab a été menée ; la tolérance observée est la même que dans les essais avec des doses moins importantes et des rémissions totales ou partielles ont été observées chez 6 des 17 patients testés (Raza et al. 2009).

b) LES ANTICORPS MONOCLONAUX EN EVALUATION PRECLINIQUE

D'autres anticorps monoclonaux ont été développés pour le traitement des LAM. Plusieurs antigènes exprimés à la surface des blastes leucémiques ont été identifiés et des études précliniques d'anticorps monoclonaux les ciblant ont été menées pour déterminer leur efficacité à cibler et à éliminer ces cellules leucémiques. Il s'agit d'anticorps ciblant CD44, CD123 et CD47.

(a) CD44

CD44 est une glycoprotéine membranaire exprimée de façon ubiquitaire et qui est impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice en liant son principal ligand l'acide hyaluronique. L'expression de CD44 est augmentée dans les cellules souches leucémiques et aurait un rôle dans le maintien des cellules souches dans la niche tumorale. En plus de ses fonctions dans l'adhérence, CD44 peut également entraîner la transduction de voies de signalisation lorsqu'il est lié à l'acide hyaluronique ou à des anticorps activateurs (L. Jin et al. 2006).

L'anticorps anti-CD44 H90 a été le premier anti-CD44 décrit. Dans une étude en 2006, Jin et collaborateurs ont montré que le traitement avec H90 de souris NOD/SCID transplantées avec des cellules primaires LAM entraînait une forte réduction des cellules souches leucémiques en bloquant leur migration et leur capacité de « nichage » (L. Jin et al. 2006). De plus, H90 entraîne la différenciation des cellules LAM visualisée par l'augmentation d'expression de marqueurs de différenciation des cellules myéloïdes : CD14, CD15 ou CD11b (R Majeti 2011).

(b) CD123

L'antigène CD123 est le récepteur à l'interleukine-3 (IL-3), il est présent sur les cellules progénitrices et sa stimulation entraîne la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il est exprimé à la surface des cellules souches leucémiques LAM et sur les cellules souches hématopoïétiques normales (mais dans une moindre mesure) (Ball & Broome 2010). Le traitement de souris NOD/SCID par un anticorps anti-CD123, appelé 7G3, empêche la greffe de cellules souches leucémiques dans ces souris. Néanmoins, cet anticorps a une efficacité limitée sur la maladie déjà établie chez la souris. 7G3 empêche le « nichage » des

cellules souches leucémiques dans le microenvironnement tumoral en partie via l'activation de l'immunité innée. 7G3 est également capable d'inhiber la fixation d'IL-3 et cela entraîne une prolifération et une survie moindre chez les cellules traitées (L. Jin et al. 2009). Un anticorps chimérique variant de 7G3, CSL360, a été créé et évalué en clinique. Cet anticorps conserve les propriétés de liaison du CD123 et de sa neutralisation mais est moins immunogénique. Son évaluation clinique en phase I sur des patients en rechute ou réfractaires avec une LAM à haut risque a donné des résultats encourageants : aucune toxicité sévère observée et sur les 8 patients traités par la plus haute dose une réponse complète a été observée (R Majeti 2011) (réf NCT00401739). Des études cliniques complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'efficacité de cet anticorps.

(c) CD47

Le CD47 est une protéine de la famille des immunoglobulines largement exprimée à la surface des cellules ; son expression est augmentée dans les cellules souches leucémiques LAM en comparaison avec les cellules souches hématopoïétiques normales. Elle est impliquée dans de multiples processus cellulaires et de nombreuses interactions cellule-cellule. Elle interagit notamment avec les macrophages et avec les cellules dendritiques. En effet, le CD47 est un ligand pour SIRPα (*Signal Regulatory Protein α*) qui est exprimé sur les cellules phagocytaires et qui, lorsqu'elle est activée, inhibe la phagocytose. L'expression de CD47 à la surface des cellules souches leucémiques LAM peut ainsi contribuer à la pathogénicité en inhibant leur phagocytose. Cette capacité a été démontrée dans une étude dans laquelle l'expression de CD47 dans des cellules LAM non porteuses de CD47 entraîne une inhibition de la phagocytose et facilite la formation de tumeur chez la souris (Jaiswal et al. 2009).

Les thérapies anti-CD47 ont donc été testées en espérant réduire la capacité d'inhibition de la phagocytose par CD47 :

- L'étude *in vitro* de l'utilisation d'anticorps bloquant l'interaction CD47-SIRPα a montré que celui-ci entraîne la levée de l'inhibition de la phagocytose des cellules souches LAM (Ravindra Majeti, M. P. Chao, et al. 2009).
- L'étude *in vivo* de la capacité de greffe de cellules incubées avec un anti-CD47 ou un anti-IgG1 ou un anti-CD45 a montré que les cellules incubées avec les anti-CD47 n'étaient pas capables de former de tumeur chez des souris à la différence des contrôles anti-CD45 et anti-IgG1 (Ravindra Majeti, M. P. Chao, et al. 2009). Cette étude montre également que de hauts niveaux d'expression de CD47 sur les cellules souches leucémiques de patients atteints de LAM sont prédictifs de la résistance à la chimiothérapie (Ravindra Majeti, M. P. Chao, et al. 2009).

4. CIBLER LES ANOMALIES GENETIQUES : LES MODULATEURS EPIGENETIQUE

Les altérations de la fonction des gènes peuvent être dues à des mutations dans la séquence génique mais également à des changements dans la machinerie épigénétique. Les composants de la machinerie épigénétique, à savoir la méthylation de l'ADN et les modifications covalentes des histones jouent un rôle dans l'expression des gènes dans le contexte du cancer. Dans les LAM, des modifications du degré de méthylation des gènes et des augmentations de l'acétylation des histones sont observées et entraînent une transcription aberrante de certains gènes. Ces modifications épigénétiques peuvent être associées à la présence de certaines protéines de fusion telles que PML/RAR, RUNX1/ETO, CBF α /MYH11 qui exercent leurs effets oncogéniques par le recrutement aberrant de complexes répresseurs de la transcription contenant des méthyltransférases et des histones déacétylases, mais aussi à des mutations directes dans la machinerie épigénétique telles que des mutations des histones acétyltransférases ou des méthyltransférases (Leone et al. 2008).

Figure 17 : Pas d'autorisation de diffusion

Ces aberrations dans la machinerie épigénétique ont conduit à développer des traitements hypométhylants et des inhibiteurs d'histone déacétylases.

a) LES TRAITEMENTS HYPOMETHYLANTS

La modification covalente de certaines cytosines dans des dinucléotides CpG par ajout d'un groupe méthyl par les méthyltransférases est un processus épigénétique permettant la régulation de l'expression des gènes. En effet, les dinucléotides CpG se trouvent dans des régions proches des promoteurs des gènes et leur méthylation entraîne une inhibition de l'expression des gènes concernés. Dans les cellules cancéreuses, on observe une hyperméthylation de certains îlots d'une part et l'hypométhylation de larges régions d'ADN d'autre part. Ces modifications entraînent un fonctionnement aberrant des gènes avec soit une transcription augmentée soit une transcription diminuée (Schoofs & Müller-Tidow 2011). L'hyperméthylation observée dans les cancers est retrouvée dans des gènes particuliers et notamment dans des gènes dont l'inhibition entraîne des caractéristiques de cellule souche (Schoofs & Müller-Tidow 2011) ou dans des gènes suppresseurs de tumeurs. Des agents hypométhylants ont donc été étudiés pour tenter de réactiver la transcription de ces gènes inhibés.

–Les études précliniques :

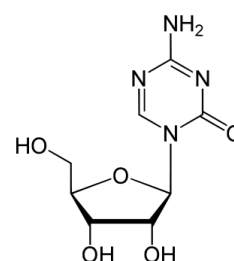
Les deux principaux agents hypométhylants sont l'azacytidine et la décitabine. Ces deux inhibiteurs de méthyltransférase sont des analogues pyrimidiques de la cytidine et peuvent être incorporés dans l'ARN et/ou l'ADN et entraîner une inhibition irréversible des ADN méthyltransférases. Plusieurs études ont confirmé que ces agents entraînent une déméthylation

de l'ADN mais il reste incertain que cela soit le principal mécanisme d'action de ces molécules. En effet, des études ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la déméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p15, E-cadhérine, DAPK-1 et SOCS-1 et la réponse clinique aux agents hypométhylants (Fandy et al. 2009). Une autre étude a montré que l'hypométhylation de certaines séquences répétées du génome (LINE) et l'activité des agents. Néanmoins, cette étude a également montré une association entre l'augmentation de l'expression de p15 et la réponse clinique (H. Kantarjian et al. 2007).

La taille des cohortes et le nombre de gènes étudiés ainsi que la difficulté d'appréhender la méthylation des gènes rendent nécessaires des études complémentaires afin de préciser les effets de ces molécules. De plus, le mode d'action de l'azacytidine et la décitabine, que l'on pensait commun aux deux molécules, semble être en réalité quelque peu différent puisque des études ont montré que l'azacytidine est capable de fixer à la fois l'ADN et l'ARN alors que la décitabine n'est capable de fixer que l'ADN (Schoofs & Müller-Tidow 2011). Cela entraîne des conséquences différentes sur la synthèse protéique lors du traitement avec ces deux molécules.

–Les études cliniques :

- Azacytidine (Vidaza®) :

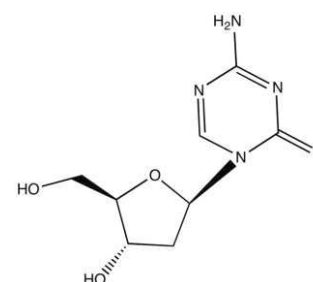


L'activité clinique significative observée dans les SMD a entraîné la mise sur le marché par Celgene corporation de l'azacytidine pour le traitement de ces pathologies sous le nom de Vidaza® (Prebet & Vey 2011). De nombreuses études précliniques et cliniques sont en cours pour l'évaluation de cette molécule chez des patients atteints de LAM.

Une étude rétrospective analysant les études faites chez des patients diagnostiqués comme atteints de AREB traités par l'azacytidine et qui, selon les nouveaux critères de la classification de l'OMS en 2008, sont maintenant considérés comme atteints de LAM, a montré que sur les 82 patients étudiés 26 avaient répondu à l'azacytidine (dont 12 ont atteint la rémission complète) (Maurillo et al. 2012). Une étude de phase I/II a été menée pour évaluer l'efficacité et la non toxicité de l'azacytidine chez des patients ne pouvant pas recevoir de chimiothérapie conventionnelles (20 patients) ou étant résistants à ces traitements (20 patients). Cinquante pour cent des patients du premier groupe ont répondu au traitement et 10% du second. De plus, le traitement a été bien toléré (Al-Ali et al. 2012). De nombreuses études d'association de l'azacytidine avec d'autres molécules et notamment avec des inhibiteurs d'histones déacétylases (voir paragraphe suivant) sont en cours (97 études cliniques répertoriées sur clinicaltrials.gov).

- Décitabine (Dacogen®, Janssen Pharmaceutica) :

De nombreuses études cliniques sont également en cours pour évaluer la décitabine. Une étude de phase II évaluant l'efficacité de la décitabine en traitement de première intention chez des patients



âgés ne pouvant pas bénéficier des traitements chimiothérapeutiques conventionnels a été menée. Deux cents vingt-sept patients ont été inclus dans l'étude, 26% d'entre eux ont répondu au traitement et les toxicités les plus graves observées sont une insuffisance médullaire (Lübbert et al. 2012). Des études d'association sont également en cours (58 études cliniques répertoriées sur clinicaltrials.gov).

b) LES INHIBITEURS D'HISTONES DEACETYLASES

Les histones composent le nucléosome, une structure permettant la compaction de la chromatine. La structure de la chromatine, compactée ou lâche, est importante dans la modulation de la transcription des gènes, et la modification covalente des histones entraîne la modification du degré de compaction de la chromatine. L'acétylation est une des modifications majeures des histones associées à la régulation de l'expression des gènes ; en effet l'acétylation des résidus lysine des histones entraîne une ouverture de la chromatine et donc une transcription des gènes, alors que la déacétylation entraîne l'effet contraire.

L'observation d'activation aberrante des histones déacétylases (HDAC) dans les LAM a conduit au développement d'inhibiteurs de ces protéines appelés HDAC-I. Ces inhibiteurs ont plusieurs effets biologiques sur les cellules cancéreuses ; ils entraînent une différenciation, un arrêt de croissance et/ou une apoptose des cellules. Au contraire, les cellules normales semblent être résistantes à ces traitements.

– Les études précliniques :

Les mécanismes d'action de ces inhibiteurs sont multiples et concernent à la fois une modification de l'acétylation des histones, mais aussi des effets sur d'autres protéines. En effet, l'activité des HDAC n'étant pas restreinte aux histones de nombreuses protéines participent également à l'action des HDACI.

L'étude de cellules leucémiques traitées par des HDACI a montré que 10% à 20% des gènes sont réprimés et que la même proportion de gènes voit sa transcription stimulée (Quintás-Cardama et al. 2011). Dans les deux cas, ces gènes sont en contact avec des histones hyperacétylées. L'acétylation des histones autour d'un gène ne permet pas de prédire l'effet des HDACI sur son expression et n'explique pas pourquoi certains gènes sont réprimés (Pécuchet et al. 2010).

Les principaux mécanismes d'action sont :

- Arrêt du cycle cellulaire : Les HDACI entraînent l'arrêt du cycle cellulaire par la stimulation de l'expression p21 (Leone et al. 2008) et l'inhibition de l'expression de cyclines et de kinases dépendantes des cyclines (Quintás-Cardama et al. 2011). L'acétylation de p53 et de pRb ont également un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire. L'acétylation de p53 empêche sa liaison à mdm2 et prévient sa dégradation ; l'action de p53 entraîne l'expression de p21 (Pécuchet et al. 2010). L'acétylation de pRb maintient son activation et lui permet de

jouer son contrôle négatif du cycle cellulaire induisant un arrêt du cycle en G1 et G2 (Pécuchet et al. 2010).

- Induction de l'apoptose via les voies intrinsèques et extrinsèques : Les HDACI entraînent une augmentation de l'expression des récepteurs de mort et de leurs ligands et augmentent également les niveaux de certaines molécules pro-apoptotiques telles que Bax, Bak, Bim et diminuent le taux des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, survivine, XIAP (Quintás-Cardama et al. 2011). Ces modifications ne se font pas seulement par ouverture de la chromatine mais également par action des HDACI sur des voies de signalisation telles que NF- κ B, JNK... (Quintás-Cardama et al. 2011).

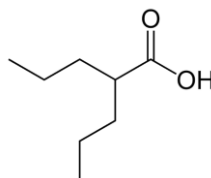
- Induction de la différenciation dans les cellules portant des protéines de fusion : Inhibition de complexes tels que PML/RAR α /HDAC permettant une réexpression des gènes de différenciation myéloïdes (Pécuchet et al. 2010).

- Production de ROS : La production de ROS est observée lors de l'utilisation de plusieurs HDACI tels que vorinostat ou entinostat et pourrait participer à la mort cellulaire induite par les HDACI (Quintás-Cardama et al. 2011).

– Les études cliniques :

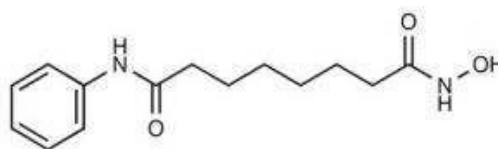
Les HDACI les plus avancés en étude clinique sont l'acide valproïque, le vorinostat, l'entinostat et le panobinostat.

- Acide valproïque (VPA) :



Une étude de phase I a montré 44% de réponse chez des patients atteints de LAM ou de SMD à haut risque lors du traitement avec l'acide valproïque (Kuendgen et al. 2004). Une étude de phase I/II a évalué la combinaison de VPA, azacitidine et ATRA chez 53 patients atteints de LAM ou SMD réfractaires. Quarante-deux pour cent des patients ont répondu au traitement dont 12% ont atteint la rémission complète. Néanmoins, des toxicités limitantes ont été observées (neurotoxicité) (Soriano et al. 2007). Une étude de phase II, combinant également VPA, azacitidine et ATRA a montré 26% de réponse parmi les patients (Raffoux et al. 2010). L'association de VPA et de décitabine a donné des résultats prometteurs également ; une étude de phase I a montré une réponse clinique chez 22% des patients (Guillermo Garcia-Manero et al. 2006).

- Vorinostat (Zolinza ®, SAHA):
(Développé par MERCK)



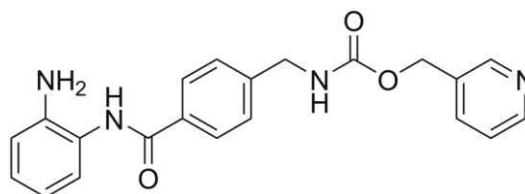
Une étude de phase I a été menée impliquant 31 patients en rechute ou avec une LAM réfractaire. Sept patients ont répondu au traitement, incluant deux rémissions complètes et deux rémissions complètes sans retour à un compte normal de leucocytes. Une acétylation de l'histone H3 a été observée chez tous les patients (Guillermo Garcia-Manero et al. 2008). Une étude de phase II randomisée comparant deux schémas d'administration du Vorinostat chez des patients en rechute ou avec une LAM réfractaire n'a montré aucun effet de cette molécule. Néanmoins, les patients n'ont reçu que un ou deux cycles d'administration, cela n'était peut-être pas suffisant pour entraîner une réponse clinique (Schaefer et al. 2009).

Des études d'association avec des chimiothérapies conventionnelles ont été menées. Une étude de phase I associant le vorinostat avec l'idarubicine dans les LAM en rechute ou réfractaires a entraîné des réponses cliniques chez 17% des patients et le traitement est généralement bien supporté (quelques toxicités de grade 3 et 4 ont été observées) (Kadia et al. 2010).

De plus, des études combinant le vorinostat avec l'azacitidine ou avec la décitabine ont apporté des résultats très encourageants avec un taux de réponse de 86% dans un cas et de 41% dans l'autre (Quintás-Cardama et al. 2011).

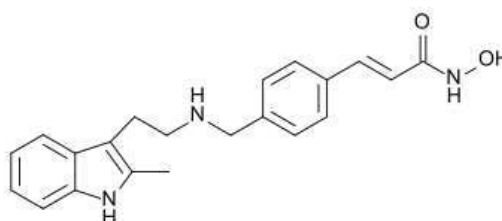
Six études cliniques sont actuellement en cours pour évaluer le Vorinostat en association avec d'autres molécules.

- Entinostat (MS-275, développé par Syndax Pharmaceuticals) :



Une étude de phase I dans laquelle l'entinostat était administré à des patients atteints de LAM avancée n'a pas pu mettre en évidence une efficacité de cette molécule sur ces patients (Ivana Gojo et al. 2007). Au contraire, une étude d'association de l'entinostat avec l'azacitidine chez des patients atteints de leucémies aiguës ont montré une réponse chez 44% d'entre eux (Quintás-Cardama et al. 2011). Six études de l'entinostat en association avec d'autres molécules sont en cours dont 3 viennent de se terminer, les résultats ne sont pas encore publiés.

- Panobinostat (LBH589, développé par Novartis) :



Une étude de phase I a été menée impliquant 13 patients atteints de LAM : des toxicités cardiaques limitantes ont été observées conduisant à l'interruption de l'étude (F. Giles et al. 2006). Des schémas d'administration différents ont

montré une toxicité cardiaque moindre autorisant à poursuivre les études cliniques. Une étude de phase II évaluant l'efficacité du panobinostat en administration seule chez des patients atteints de LAM réfractaires est actuellement en cours (réf : NCT00880269). Dix études de phase I combinant le panobinostat avec des chimiothérapies conventionnelles ou avec l'azacidine sont également en cours.

5. CIBLER LES VOIES DEREGULEES DANS LES LAM

a) LES VOIES D'APOPTOSE

Pour survivre, les cellules cancéreuses acquièrent des anomalies leur permettant de résister à l'apoptose. Un des moyens qu'elles utilisent est la surexpression des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 ou Bcl-xl. Cibler ces molécules anti-apoptotiques est donc une thérapie intéressante car elle cible spécifiquement un mécanisme de survie des cellules cancéreuses afin d'éliminer de façon spécifique ces cellules (Chonghaile & A Letai 2008). Dans les LAM, la surexpression de Bcl-2 a été observée et il a été montré qu'un rapport Bcl-2/Bax élevé est un pronostic défavorable pour les patients (Del Poeta et al. 2003) (voir paragraphe dérégulation de l'apoptose dans les LAM p 51).

Une des premières stratégies utilisées pour cibler les membres de la famille Bcl-2 est l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour éteindre l'expression de ces gènes. Une stratégie récente est l'utilisation de BH3-mimétiques qui miment le rôle pro-apoptotique des BH3-only.

(1) LES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS

(a) OBLIMERSEN (GENASENSE®) CIBLE BCL-2

Oblimersen (Genasense®) est un oligonucléotide antisens qui lie les 6 premiers codons de la partie codante de l'ARNm de Bcl-2. Il cible l'ARNm de Bcl-2 dans le cytoplasme en formant des hétéroduplexes aberrants. Ces hétéroduplexes sont immédiatement clivés par la RNase-H cytoplasmique, l'ARNm Bcl-2 est alors dégradé mais pas l'oligonucléotide antisens créé pour résister à cette dégradation : il peut alors s'hybrider sur un autre ARNm codant pour Bcl-2.

–Les études précliniques :

Des études précliniques ont montré qu'oblimersen diminue bien l'expression de Bcl-2 et sensibilise les cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Klasa et al. 2002). Les études de modèles de souris atteintes de lymphomes ont montré que la survie est augmentée lorsque les souris sont traitées par oblimersen avant un traitement par le rituximab (anticorps anti-CD20) ou avant un traitement par le bortezomib (inhibiteur du protéasome) (Chanan-Khan 2004).

– Les études cliniques :

L'efficacité d'oblimersen sur les LAM a été étudiée en clinique, seul ou en combinaison. Une première étude de phase I a été menée pour déterminer l'apport de la suppression de Bcl-2 vis-à-vis de la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie chez des patients atteints d'une leucémie aiguë myéloïde réfractaire ou en rechute (Marcucci et al. 2003). Les patients sont traités avec des doses croissantes d'oblimersen en association avec fludarabine, cytarabine et GM-CSF. Cinq patients sur 17 patients testés (29%) sont entrés en rémission complète et les toxicités constatées ne sont pas limitantes pour le traitement. Une deuxième étude de phase I a consisté à associer oblimersen avec la thérapie d'induction (cytarabine et daunorubicine) puis, avec le traitement de consolidation (hautes doses de cytarabine) chez des patients âgés nouvellement diagnostiqués pour une LAM (Marcucci et al. 2005). Vingt-neuf patients ont été traités et 14 (48%) sont entrés en rémission complète, de plus aucune toxicité susceptible d'entraîner l'arrêt du traitement n'a été rapportée. Une étude de phase III, randomisée, comparant le traitement d'induction et de consolidation par cytarabine et daunorubicine avec ou sans ajout d'oblimersen chez des patients âgés nouvellement diagnostiqués, n'a pas pu montrer de différences statistiques au niveau des taux de rémission complète entre les patients ayant reçu oblimersen et ceux ne l'ayant pas reçu. Cette molécule est développée par Genta Incorporated.

(b) AEG35156 CIBLE XIAP

Une autre protéine anti-apoptotique surexprimée dans les LAM est XIAP. XIAP fait partie de la famille des IAP et inhibe les caspases 3, 7 et 9. La surexpression de XIAP entraîne une chimiorésistance dans les cellules leucémiques et les inhibiteurs (de nature chimique ou génétique) de XIAP ont pour effet d'activer les caspases, de sensibiliser les cellules à la chimiothérapie et d'entraîner l'apoptose des cellules LAM (Aaron D Schimmer et al. 2009). Un oligonucléotide antisens liant l'ARNm codant pour XIAP et qui permet d'éteindre son expression dans la cellule a été mis au point : AEG35156. Il est développé par Aegea Therapeutics.

– Les études précliniques :

AEG35156 est capable d'inhiber l'expression de sa cible après administration systémique à des souris, cette administration sensibilise les cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Aaron D Schimmer et al. 2009).

– Les études cliniques :

Une étude de phase I/II a été menée, combinant des doses croissantes de AEG35156 et une chimiothérapie d'induction (haute dose de cytarabine et idarubicine) chez des patients en rechute ou avec une LAM réfractaire (Aaron D Schimmer et al. 2009). Le taux de réponse est plus important chez les patients qui ont reçu la plus haute dose de AEG35156 avec 47% des

patients qui ont atteint la rémission complète et seulement 4% chez les patients ayant reçu des doses plus faibles. Parmi les patients qui ont reçu la dose la plus élevée, 90% étaient atteints d'une LAM réfractaire à la chimiothérapie d'induction et ont atteint la rémission complète avec le traitement de ré-induction AEG35156 en combinaison avec la chimiothérapie.

(2) LES BH3-MIMÉTIQUES

Les oligonucléotides antisens entraînent une réduction du niveau d'expression des anti-apoptotiques, mais une autre stratégie émerge, consistant cette fois à antagoniser la fonction de ces anti-apoptotiques, il s'agit de la création de BH3-mimétiques. Cette stratégie a été rendue possible par la résolution cristallographique de Bcl-xl qui a révélé que les domaines BH1-BH3 forment un sillon hydrophobe avec lequel l'hélice α des protéines BH3-only peut interagir (Chonghaile & A Letai 2008). Les BH3-mimétiques miment l'action des BH3-only et interagissent avec les protéines anti-apoptotiques les empêchant de jouer leur rôle anti-apoptotique. A la différence des oligonucléotides antisens, ces BH3-mimétiques peuvent cibler plusieurs protéines anti-apoptotiques.

(a) ABT-737

ABT-737 est le plus étudié de tous les BH3-mimétiques. Il lie avec une haute affinité Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w ($K_i < 1\text{nM}$) et avec une plus faible affinité Mcl-1 et A1 ($K_i > 460\text{nM}$). Son spectre d'interaction ressemble ainsi à celui de Bad. Il antagonise l'action anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xl et entraîne la libération du cytochrome c dans divers types cellulaires (Labi et al. 2008).

– Etudes précliniques :

Dans leur étude Konopleva et collègues (Marina Konopleva et al. 2006) observent que ABT-737 induit efficacement l'apoptose dans des lignées cellulaires représentatives de LAM et dans les cellules primaires de patients atteints de LAM. Cet effet requiert la présence de Bak et Bax impliquant une action restreinte de ABT-737 sur la régulation des équilibres pro- et anti-apoptotiques. ABT-737 inhibe l'interaction Bcl-2/Bax et induit un changement de conformation de Bax, témoignant de son activation (Marina Konopleva et al. 2006). De plus, ce BH3-mimétique cible les cellules souches leucémiques sans affecter les cellules progénitrices normales (Marina Konopleva et al. 2006).

L'étude de modèle de xénogreffe a montré que ABT-737 est efficace *in vivo*, le traitement des souris par ABT-737 entraîne une réduction de la tumeur de 50% et augmente le temps de survie des animaux de 2 fois. De plus, ABT-737 n'entraîne pas de toxicité dans les tissus normaux (Marina Konopleva et al. 2006).

Cependant, des résistances à ABT-737 ont été observées dans certains types de cellulaires, les tumeurs insensibles à ce BH3-mimétique expriment fortement Mcl-1 (Labi et al. 2008). Concernant les LAM, la résistance à ABT-737 corrèle également aux taux de Mcl-1 : certaines lignées, ainsi que les cellules primaires et les cellules progénitrices CD34+ ont des

taux de Mcl-1 importants et la faible affinité de ABT-737 pour Mcl-1 entraîne leur résistance au traitement (Marina Konopleva et al. 2006). En outre, les cellules peuvent devenir résistantes en augmentant leur expression de Mcl-1 en réponse à ABT-737 (M Konopleva et al. 2012).

En conséquence, des co-traitements combinant ABT-737 et l'inhibition de Mcl-1 ont été étudiés : l'expression de Mcl-1 est régulée par la voie MAPK et l'utilisation d'un inhibiteur de MEK en combinaison avec ABT-737 augmente l'apoptose des cellules leucémiques (M Konopleva et al. 2012).

– Les études cliniques :

ABT-263 (Navitoclax®), l'analogue de ABT-737 actif par voie orale est actuellement en évaluation clinique pour les cancers du poumons à petites cellules et pour les lymphopathies malignes et ont donné des premiers résultats prometteurs (M Konopleva et al. 2012). Cette molécule est développée par Abbott.

(b) GX15-070 OU OBATOCLAX

Obatoclax ou GX15-070 est un BH3-mimétique capable de cibler tous les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 notamment Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Mcl-1. Cependant, il les lie avec une affinité plus faible que ABT-737 (M. H. Kang & C. P. Reynolds 2009) ($K_i = 220\text{nM}$ pour Bcl-2, $0,5\mu\text{M}$ pour Bcl-xl, Bcl-w et Mcl-1 (M. H. Kang & C. P. Reynolds 2009)). Il a été découvert par la compagnie biopharmaceutique Gemin X.

– Etudes précliniques :

Des études ont montré qu'obatoclax a des activités antitumorales sur de nombreux types cellulaires notamment sur les cellules leucémiques. Il inhibe la croissance des lignées représentatives des LAM ainsi que des cellules CD34+ d'échantillons de patients atteints de LAM (Marina Konopleva et al. 2008). Cette inhibition de croissance est associée à une induction d'apoptose dans les deux cas (Marina Konopleva et al. 2008). Ces activités sont médiées par différents mécanismes : dans les cellules leucémiques, il entraîne l'apoptose des cellules via l'induction de la dissociation de Bak de Mcl-1 ou de Bcl-xl autorisant Bak à jouer son rôle pro-apoptotique ; de la même façon obatoclax entraîne la dissociation de Bim de Mcl-1 ou de Bcl-2 (Rahmani et al. 2012). Néanmoins, l'inhibition de ces interactions n'est pas le seul mécanisme mis en jeu. En effet, dans des cellules déficientes pour Bax et Bak, l'apoptose induite par obatoclax n'est pas totalement inhibée (Marina Konopleva et al. 2008) alors que Bax et Bak sont les effecteurs de la réponse pro-apoptotique, induite de la rupture d'équilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Finalement, obatoclax est également capable d'induire une mort cellulaire dépendante de l'autophagie ou de la nécroptose et d'inhiber la prolifération cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire (Rahmani et al. 2012).

– Les études cliniques :

Obatoclax est actuellement en évaluation clinique dans plusieurs pathologies telles que le cancer du poumon, la leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes... en association avec des chimiothérapies conventionnelles ou non. Concernant les leucémies, un essai clinique de phase I a été mené sur des patients atteints de leucémie réfractaire ou de myélodysplasies. Les conclusions de cette étude sont : d'une part une bonne tolérance vis-à-vis de ce composé chez les patients et d'autre part une efficacité accrue chez un patient portant une translocation MLL (Aaron D Schimmer et al. 2008). Une autre étude, achevée en 2010, a concerné l'efficacité d'obatoclax utilisé seul chez des patients atteints de LAM et non traités auparavant (NCT00684918). Les résultats de cette étude n'ont pas encore été communiqués.

b) LES VOIES DE SURVIE : CIBLER LES VOIES DES RECEPTEURS A TYROSINE KINASE

(1) CIBLER LES RECEPTEURS

(a) ANTI-FLT3

FLT3 code pour un récepteur tyrosine kinase qui est exprimé normalement dans les cellules souches hématopoïétiques mais dont l'expression est absente dans la cellule différenciée. Avec d'autres facteurs de croissance, FLT3 joue un rôle crucial dans l'hématopoïèse normale et la croissance cellulaire des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques. Le récepteur FLT3 est exprimé de façon aberrante chez 70% à 100% des patients LAM, et des mutations activatrices sont observées chez approximativement 30% des patients. (Voir mutation de type 1, p 29). Cette activation constitutive entraîne la prolifération et la survie des blastes.

Plusieurs inhibiteurs de FLT3, notamment des inhibiteurs de tyrosine kinase et des anticorps monoclonaux, ont montré des activités antitumorales (Pemmaraju et al. 2011).

(i) LES INHIBITEURS DE TYROSINE KINASE

A ce jour, une vingtaine d'inhibiteurs anti-FLT3 sont décrits dans la littérature. Les composés actuellement en développement sont des composés hétérocycliques qui miment le cycle purine de l'adénosine pour s'insérer dans le site de liaison de l'ATP du récepteur, entrant ainsi en compétition avec l'ATP (S. Takahashi 2011b). Ces inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) bloquent ainsi le signal aberrant de FLT3.

Les composés en essai clinique actuellement sont midostaurin (PKC-412, molécule de Novartis), lestaurtinib (CEP-701, développé par Cephalon), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar® développé par Bayer), sunitinib (SU11248, Sutent®, développé par Pfizer), KW-2449 (Kyowa Hakko Kirin Pharma), AC220 (Quizartinib, Astellas Pharma), AP-24534

(Ponatinib, développé par ARIAD Pharmaceuticals) et SB1518 (S*Bio). (Pemmaraju et al. 2011) (figure 18).

– Les études précliniques :

Des études de corrélation entre l'efficacité observée *in vitro* lors de l'utilisation de certains de ces composés (midostaurin, lestaurtinib, sorafenib, sunitinib et AC220) sur des échantillons de cellules LAM de patients participants à des essais cliniques et l'efficacité *in vivo* de ces composés chez ces mêmes patients ont montré que les réponses cytotoxiques *in vitro* sont prédictives de la réponse clinique (Pratz et al. 2010).

En effet, les différentes études *in vitro* ont montré que :

- Ces inhibiteurs induisent la mort des cellules portant des mutations FLT3 activatrices ; ceci est observé dans des lignées et dans des échantillons de patients avec des effets variables sur les cellules portant un récepteur FLT3 non muté, vraisemblablement à cause de leur différence de sélectivité. Certains inhibiteurs étant hautement sélectifs de FLT3 tels que AC220 et sorafenib, d'autres de sélectivité intermédiaire tels que sunitinib et KW-2449, et enfin certains peu sélectifs tels que lestaurtinib et midostaurin (Pemmaraju et al. 2011) (figure 19).

Par exemple, lestaurtinib a été initialement développé comme inhibiteur de TrkA (*TRK1-transforming tyrosine kinase protein*) récepteur pour NGF (*Nerve Growth Factor*) qui a un rôle dans le développement des neurones. Il a été ensuite caractérisé pour sa capacité d'inhibition de FLT3 et plus particulièrement FLT3-IDT tout en ciblant TrkA, VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*). Midostaurin inhibe aussi bien PDGFR β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*), c-kit et c-FMS. Ces larges spectres d'activité pourraient expliquer l'action de ces inhibiteurs sur les cellules avec un FLT3 non muté par l'action sur des cibles distinctes de FLT3 (Weisberg et al. 2009).

- La sensibilité individuelle aux différents inhibiteurs dépend des mutations FLT3 présentes. Cela est démontré pour les mutations ponctuelles : les changements dans la structure moléculaire de la boucle d'activation, causés par différentes mutations ponctuelles, influencent la réponse aux inhibiteurs *in vitro* (Knapper 2011).

- Les blastes de patients portants des mutations activatrices de FLT3 sont résistants de façon inhérente à la mort cellulaire induite par les inhibiteurs FLT3 ; malgré l'inhibition du signal FLT3, d'autres signaux en aval tels que STAT5 ou la voie MAPK restent actifs grâce à des mécanismes de compensation. Cette capacité à être indépendant de l'inhibition de FLT3 semble être une caractéristique de patients nouvellement diagnostiqués. En conclusion, l'efficacité de ces inhibiteurs varie selon la dépendance des cellules vis-à-vis de FLT3 : l'effet cytotoxique est observé lorsque la phosphorylation FLT3 est inhibée à plus de 90% (Knapper 2011).

Une étude récente globale de comparaison de plusieurs inhibiteurs sur des lignées et des cellules de patients mutées pour FLT3 confirme ces résultats : l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur FLT3-ITD ne garantit pas l'induction de la mort cellulaire, certaines cellules portant cette mutation n'étant pas dépendante de l'activation FLT3, les inhibiteurs FLT3 entraînent des réponses différentes selon les inhibiteurs et les récepteurs, les LAM FLT3-ITD en rechute sont plus sensibles à l'inhibition de FLT3 que les LAM nouvellement diagnostiquées et les cas avec un rapport allélique en faveur de l'allèle FLT3-ITD muté sont plus sensibles que les cas avec un rapport faible (Pratz et al. 2010, p.3). Ceci suggère que les patients nouvellement diagnostiqués peuvent être traités avec des agents peu sélectifs de FLT3 capables de cibler d'autres tyrosines kinases pour pallier l'induction d'autres voies tandis que les patients en rechute pourraient être traités avec des agents sélectifs de FLT3 (Pratz et al. 2010).

Figure 18 : Pas d'autorisation de diffusion

–Les études cliniques :

Les inhibiteurs FLT3 ont été testés seuls et en combinaison avec d'autres thérapies dans des LAM en rechute ou réfractaires et dans des LAM nouvellement diagnostiquées.

Les essais cliniques de ces inhibiteurs en monothérapie ont donné des résultats décevants à la fois au niveau de l'efficacité et de la durée d'inhibition. Les principaux problèmes identifiés lors de ces essais sont la mauvaise biodisponibilité de ces inhibiteurs et le développement de résistances.

- Biodisponibilité : La plupart des inhibiteurs testés se lie fortement aux protéines plasmatiques et dans certains cas seul 1% de la molécule est libre dans le plasma : les concentrations ne sont donc pas assez élevées pour inhiber FLT3. Il faut augmenter les doses administrées mais des problèmes de tolérance se posent alors chez certains patients. Néanmoins, les inhibiteurs sorafenib et AC220 ont montré une inhibition presque complète de FLT3 à des concentrations tolérables pour les patients (Knapper 2011).

- Résistances : Il existe des résistances innées aux inhibiteurs FLT3 (voir paragraphe études précliniques p 83) qui expliquent la différence d'efficacité des traitements selon les inhibiteurs et selon les patients mais des résistances acquises sont également observées. Ces résistances acquises expliquent que la plupart des réponses cliniques à ces inhibiteurs en monothérapies sont transitoires ; elles ne durent quelques semaines.

Ces résistances peuvent être dues à :

→ L'acquisition de nouvelles mutations dans le domaine TK : Heidel et ses collègues ont identifié une mutation ponctuelle chez un patient sensible au midostaurin (PKC-412) et devenu résistant après 280 jours de traitement (Heidel et al. 2006). Cette mutation avait été préalablement identifiée comme conférant une résistance au midostaurin (Cools et al. 2004).

→ L'augmentation de l'expression de FLT3 lors du traitement est également un mécanisme de résistance : l'étude de l'expression de FLT3 chez des patients sous monothérapie lestaurtinib a montré que celle-ci était augmentée chez 13 des 14 patients testés (Knapper et al. 2006).

→ Des hauts niveaux d'expression du ligand de FLT3 (FLT3-L): les niveaux de ligand FLT3 peuvent augmenter après la chimiothérapie et en particulier lors de l'administration de différents cycles de chimiothérapie. Récemment, il a été montré que les patients en rechute après un co-traitement lestaurtinib-chimiothérapie conventionnelle ont un taux de ligand FLT3 plus haut que les patients recevant leur premier traitement d'induction. Ce taux de ligand empêche l'action d'inhibiteurs de FLT3 de façon modeste mais très reproductible et pourrait être responsable en partie de résistance secondaire au traitement (Sato et al. 2011).

→ L'activation de voies de signalisation parallèles : Des études utilisant des lignées cellulaires devenues résistantes aux inhibiteurs FLT3 après un traitement prolongé avec ces inhibiteurs ont montré que ces cellules deviennent résistantes le plus souvent à cause de l'activation de voies de signalisation qui apportent des signaux compensatoires de prolifération et de survie lorsque FLT3 est inhibé. Le travail de Piloto et collègues a montré que l'exposition de cellules dépendantes à FLT3 au lestaurtinib pendant plusieurs mois entraîne l'apparition de cellules résistantes qui ont des activations de AKT et ERK alors que FLT3 est toujours inhibé. Dans deux lignées résistantes les auteurs ont observé l'apparition de nouvelles mutations NRAS pouvant expliquer ces activations (Piloto et al. 2007). De plus, des molécules anti-apoptotiques telles que Mcl-1, Bcl-2 et survivine sont surexprimées dans les cellules résistantes (Knapper 2011).

Une nouvelle génération d'inhibiteurs FLT3 est en cours de développement, plus spécifique de FLT3 que les précédentes molécules qui avaient un spectre d'interaction beaucoup plus large (figure 19). Cette spécificité restreinte à FLT3 pourrait entraîner une amélioration des effets thérapeutiques notamment chez les patients en rechute où les cellules ont un rapport allèle muté/allèle non muté important.

Figure 19: Pas d'autorisation de diffusion

AC220 est le plus prometteur et le plus avancé dans l'évaluation clinique de tous les inhibiteurs FLT3 de nouvelle génération. L'inhibition totale de FLT3 observée chez des patients à des doses pharmacologiques aisément atteignables autorise de grands espoirs pour le développement de thérapies anti-FLT3. AC220 a été évalué en phase I dans un essai incluant 76 patients âgés en rechute, réfractaires ou non traités et a entraîné une rémission complète chez 12% des patients et une rémission partielle chez 18% des patients (Daver & Cortes 2012). Huit essais cliniques concernant AC220 sont actuellement en cours dont une étude de phase II. (réf: NCT 00989261) Néanmoins, des résistances secondaires sont observées chez les patients traités avec l'apparition de mutations dans le domaine kinase de FLT3-ITD (C. C. Smith et al. 2012).

Si l'utilisation d'AC220 en monothérapie suscite de nombreux espoirs, de plus en plus d'éléments sont favorables au développement de thérapies combinées pour AC220 et également pour d'autres agents anti-FLT3. Une approche synergique entre des inhibiteurs FLT3 et d'autres traitements ciblés ou avec des thérapies conventionnelles pourrait améliorer les réponses et réduire les résistances :

– **De nombreuses combinaisons entre agents anti-FLT3 et agents chimiothérapeutiques** ont été étudiées *in vitro* : lestaurtinib synergise avec la cytarabine, daunorubicine, mitoxantrone et étoposide lorsqu'il est administré de façon simultanée ou immédiatement après la chimiothérapie (M. Levis et al. 2004). Le sunitinib synergise avec la daunorubicine ou la cytarabine dans des cellules FLT3-ITD (K. W. H. Yee et al. 2004). Plusieurs essais cliniques sont en cours associant agents anti-FLT3 et chimiothérapie conventionnelles. Par exemple, un essai, commencé en mars 2012, porte sur l'association entre la midostaurin et la cytarabine et la daunorubicine (réf : NCT01477606) et un autre, une étude de phase I/II récemment achevée, sur l'association entre sorafenib, idarubicin et cytarabine pour le traitement de patient de moins de 60 ans atteints de LAM ou de MDS à hauts risques (réf : NCT00542971). Cette étude a montré une rémission complète chez 72% des patients (Clinicaltrials.gov s. d., p.00).

– **L'activation de FLT3 entraîne l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR et MAPK.** Des combinaisons de thérapies ciblées contre ces voies avec des agents anti-FLT3 ont été donc étudiées. L'étude *in vitro* de ces combinaisons a montré un effet synergique entre les inhibiteurs FLT3 et des inhibiteurs de mTOR, MAPK/ERK et HDAC (Knapper 2011). Une étude clinique de phase I est en cours afin d'évaluer la possibilité d'associer midostaurin et un inhibiteur de mTOR (évérolimus ou RAD001) (Knapper 2011).

– **Des études précliniques ont montré l'apport potentiel de la combinaison d'agents anti-FLT3 et des molécules empêchant l'interaction des cellules LAM avec les cellules stromales.** En effet la contribution du microenvironnement à la résistance des cellules aux traitements apparaît importante au vu de la différence de clairance entre les blastes de la circulation sanguine et celle des blastes de la moelle osseuse (Knapper 2011). CXCR4 est un acteur majeur des interactions cellule leucémique-cellule stromale et est impliqué dans la migration, le « nichage » et le maintien des cellules LAM dans la moelle osseuse. Cibler CXCR4 peut permettre de sensibiliser ces cellules nichées à la chimiothérapie ; en effet une synergie entre des inhibiteurs de CXCR4 et des chimiothérapies conventionnelles a récemment été observée (S. Takahashi 2011b). L'étude d'un inhibiteur de CXCR4 en combinaison avec le Sorafenib a aussi été menée *in vitro* et dans des modèles murins et montre que cet inhibiteur sensibilise les cellules à la thérapie anti-FLT3 (Zeng et al. 2009). Un essai de phase I combinant un inhibiteur de CXCR4, du G-CSF et du Sorafenib est actuellement en cours (réf : NCT00943943).

En conclusion, les agents anti-FLT3 suscitent de nombreux espoirs et de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours pour les évaluer en combinaison avec d'autres molécules.

(ii) LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Des anticorps monoclonaux dirigés contre FLT3 sont également en développement et représentent une stratégie complètement différente pour cibler FLT3. Ils bloquent sa signalisation en liant le récepteur, et donc empêchent la liaison du ligand, et en entraînent une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. L'anticorps IMC-EB10, développé par ImClone Systems, est un anticorps totalement humain liant FLT3 avec une haute affinité ($K_d = 158$ pM). Il reconnaît à la fois les formes FLT3 mutées et non mutées et inhibe la phosphorylation dépendante et indépendante du ligand de ces récepteurs. En culture cellulaire, son administration entraîne l'inhibition des voies MAPK, PI3K et STAT5 à la fois dans des modèles de lignées cellulaires et sur des échantillons de patients LAM (Yousoufian et al. 2010). En étude pré-clinique, cet anticorps a été capable de prolonger la survie des souris NOD/SCID (*NonObese Diabetic/Severe Combined Immune-Deficient*) transplantées avec FLT3-ITD (Piloto et al. 2006). L'utilisation de cet anticorps pourrait permettre de résoudre les problèmes de toxicité dus au ciblage d'autres tyrosines que FLT3 et d'acquisition de mutations secondaires pendant le traitement. Néanmoins, les anticorps ont leurs propres limites telles que des réactions d'hypersensibilité ou un contournement du traitement par la cellule par la disparition de la cible FLT3 de la surface de la cellule et possiblement la sécrétion du récepteur sous forme soluble (Yousoufian et al. 2010).

IMC-EB10 était en cours d'évaluation clinique en phase I depuis 2009 (réf : NCT00887926) mais cet essai clinique vient d'être arrêté début 2012 du fait d'un manque d'efficacité (ClinicalTrials.gov 2012).

(b) ANTI-KIT

La fréquence de mutations activatrices de Kit est faible lorsque l'on s'intéresse à des patients atteints de LAM de tous types mais devient beaucoup plus élevée lorsque l'on observe le sous-type de LAM mutée pour CBF (Faderl et al. 2009). L'imatinib (Glivec®, développé par Novartis), connu pour sa capacité d'inhibition de Bcr-Abl, une protéine de fusion retrouvée dans les leucémies myéloïdes chroniques, inhibe également c-kit et a été testé pour le traitement des LAM mutée pour ce récepteur. Malheureusement, l'imatinib n'exerce qu'un effet marginal sur les cellules LAM (Scappini et al. 2001) et un essai clinique effectué par la suite a confirmé ce résultat décevant (Cortes et al. 2003). Il fait cependant mentionner qu'un essai clinique récent combinant l'imatinib avec des chimiothérapies plus conventionnelles (mitoxantrone, étoposide et cytarabine) a montré que sur les 21 patients recrutés pour l'étude 13 (62%) avaient atteints une réponse complète (J M Brandwein et al. 2011).

Des inhibiteurs plus spécifiques de c-Kit sont en cours de développement tel que APcK110 dont les effets *in vitro* sont prometteurs. (Faderl et al. 2009).

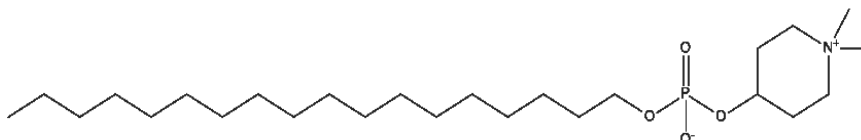
(2) INHIBITIONS DES VOIES EN AVAL

(a) PI3K/AKT/mTOR

(i) INHIBITEURS AKT

(a) PERIFOSINE

La périfosine est un alkylphospholipide qui bloque le recrutement d'Akt à la membrane

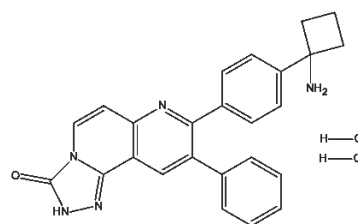


cellulaire et donc son activation. Elle est développée par Keryx pour l'Amérique du nord et par AEterna Zentaris pour le reste du monde. Elle induit *in vitro* une réduction de la prolifération et une apoptose des cellules LAM. Elle synergise avec l'étoposide(V Papa et al. 2008) et les inhibiteurs d'histone déacétylase (Rahmani et al. 2005) dans les cellules primaires de LAM. La périfosine n'est, cependant, pas spécifique de l'inhibition d'Akt puisqu'elle inhibe également la voie MAPK et active la voie JNK (Alberto M Martelli et al. 2009).

Un essai clinique de phase I combinant la périfosine et un inhibiteur de PDK1 a été mené (réf : NCT00301938, achevé en mai 2012) ainsi qu'un essai clinique de phase II évaluant l'efficacité de la périfosine. (réf : NCT00391560, achevé en février 2012). Les résultats de ces études n'ont pas encore été publiés.

(b) MK2206

MK2206 est un inhibiteur allostérique d'Akt développé par MERCK, actuellement en évaluation clinique pour le traitement des LAM : un essai clinique de phase II est en cours évaluant l'efficacité et les toxicités éventuelle de cette molécule pour le traitement des patients en rechute ou atteints d'une LAM réfractaire (réf : NCT01253447).



(c) GSK2110183

GSK2110183 est un inhibiteur d'Akt administrable oralement, il est en évaluation de phase I/II pour le traitement des hémopathies malignes (réf : NCT00881946). Il est développé par GlaxoSmithKline.

(ii) INHIBITEURS mTOR

(a) RAPAMYCINE ET ANALOGUES

La rapamycine est un antibiotique utilisé au départ pour ses activités immunosuppressives. Il a été le premier inhibiteur de mTOR découvert et de nombreux analogues seront ensuite synthétisés pour l'utilisation clinique (figure 20).

La rapamycine ne cible pas le site actif de mTORC1 mais lie FKBP12, une protéine chaperonne abondante dans la cellule. Le complexe formé modifie l'activité et la stabilité de mTORC1 via des mécanismes allostériques en liant mTORC1 dans une région éloignée du site actif (Vu & Fruman 2010). mTORC2 est considéré comme insensible à la rapamycine puisque le complexe rapamycine/FKBP12 ne lie pas mTORC2. Toutefois, l'utilisation de la rapamycine pendant une longue période entraîne également une inhibition de mTORC2 en inhibant l'assemblage du complexe mTORC2 (Sarbasov et al. 2006).

– Les études précliniques :

Bien qu'ayant un effet modeste sur la survie des cellules primaires LAM en culture liquide, la rapamycine inhibe leur capacité clonogénique et est sans effet sur les précurseurs hématopoïétiques normaux (Christian Récher et al. 2005). Cette résistance des cellules LAM à l'apoptose induite par la rapamycine semble due à différents mécanismes. Tout d'abord, l'inhibition de mTORC1 entraîne l'activation de plusieurs boucles de régulation dont la conséquence est une activation d'Akt. L'utilisation de RAD001 entraîne une accumulation de IRS-2, une protéine adaptatrice permettant l'activation de PI3K par des récepteurs tyrosine kinase, il s'agit de la première boucle de régulation. (Jerome Tamburini et al. 2008) La deuxième boucle concerne p70S6K qui est en aval de mTORC1 : l'inhibition de mTORC1 entraîne une diminution de l'activité de p70S6K or cette kinase participe à une boucle de régulation négative dans les conditions normales : elle adresse IRS-1 au protéasome pour qu'il y soit dégradé.

Néanmoins, des combinaisons de la rapamycine à d'autres molécules semblent prometteuses : par exemple la combinaison rapamycine/étoposide entraîne un effet synergique lorsqu'elle est appliquée à des cultures de cellules primaires LAM (Q. Xu et al. 2005). Dans des souris NOD/SCID cette combinaison contrecarre la prise de greffe de cellules LAM (Q. Xu et al. 2005).

– Les études cliniques :

Concernant la rapamycine, une étude pilote a été menée sur 9 patients atteints d'une leucémie réfractaire ou en rechute, 4 patients ont eu une amélioration avec une réduction de plus de 50% du nombre de blastes dans le sang et dans la moelle osseuse (Christian Récher et al. 2005). Une étude concernant des patients atteints d'une LAM secondaire ou d'une SMD n'a pas montré de réponse clinique (Callera et al. 2008).

Différents analogues de la rapamycine ont été synthétisés :

Figure 20 : Pas d'autorisation de diffusion

– CCI-779 : Nommé également **temsirolimus**, il s'agit d'une forme ester de la rapamycine ; cet ester est une prodrogue dont la métabolisation libère la rapamycine et qui est soluble dans l'eau et qui peut donc être administrée par voie orale ou intraveineuse. Il a été

approuvé comme traitement de première intention pour les patients atteints de carcinomes rénaux aux pronostics défavorables sous le nom de Torisel® (Pfizer). (Alberto M Martelli et al. 2009).

– RAD001 : nommé également **évérolimus**, il peut être administré par voie orale. Son efficacité et sa toxicité potentielle ont été évalués en étude clinique de phase I/II chez des patients atteints d'hématologies malignes réfractaires (Karen W L Yee et al. 2006). Aucune toxicité limitante pour le traitement n'a été observée mais aucun des patients atteints de LAM n'a montré de réponse partielle ou complète. Il a été approuvé pour le traitement du cancer du rein avancé chez les patients ayant progressé sous ou après une thérapie ciblée anti-VEGF (et très récemment pour le traitement des cancers du sein avancés), sous le nom de Afinitor® (Novartis).

– AP23573 : nommé également **déforolimus** ou **Ridaforolimus** (nom commercial proposé **Taltorvic®**), il est développé par MERCK et ARIAD pharmaceuticals. Il peut être administré par voie orale ou intraveineuse. Il a été testé dans une étude de phase II chez des patients atteints d'hématologies malignes dont 22 atteints de LAM ; aucun de ces patients n'a montré de réponses partielles ou complète. Les toxicités constatées sont faibles et réversibles (David A Rizzieri et al. 2008).

Plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer des inhibiteurs de mTOR en association avec une chimiothérapie conventionnelle chez des patients atteints de LAM au pronostic défavorable. Actuellement, 20 essais cliniques sont en cours combinant un inhibiteur de mTOR et une ou plusieurs autres molécules ; notamment un essai de phase II randomisé comparant plusieurs associations dont une composée du sirolimus a été engagé (réf : NCT00634244).

(b) NOUVELLE GENERATION

Des inhibiteurs qui, à la différence de la rapamycine ciblent le site actif de mTOR, sont en cours de développement préclinique.

• OSI-027 : le test de cette molécule sur des lignées cellulaires et des cultures primaires de cellules LAM a montré que OSI-027 entraîne l'inhibition de mTORC1 et mTORC2 à la différence de la rapamycine et induit des effets antileucémiques sur une large variété de lignées cellulaires et sur les cellules progénitrices de patients (Altman, Sassano, S. Kaur, et al. 2011).

• AZD8055 : cette molécule inhibe complètement l'activité de mTORC1 et mTORC2. Sur des cellules primaires LAM, AZD8055 entraîne une inhibition de prolifération, un arrêt du cycle cellulaire et une induction d'apoptose caspase-dépendante (L Willems et al. 2012). De plus, elle prolonge la survie de souris transplantées avec des cellules LAM et réduit la taille des tumeurs (L Willems et al. 2012).

(b) INHIBITEURS DES VOIES RAS/MAPK

(i) ANTI-RAS

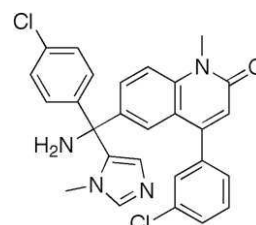
Les mutations de N-RAS et K-RAS sont retrouvées dans environ 15% des LAM et des thérapies ont été mises au point pour les inhiber. RAS subit plusieurs modifications post-traductionnelles dont une farnésylation qui lui permet de s'ancrer dans la membrane plasmique où il peut interagir avec d'autres protéines. Les inhibiteurs de farnésyltransférases inhibent l'isoprénylation correspondant au transfert d'un groupe farnésyl sur des protéines telles que RAS.

- **Les études précliniques :**

Les essais précliniques montrent que 70% des lignées cellulaires, incluant des lignées leucémiques, sont sensibles aux inhibiteurs de farnésyltransférases avec une réduction de la prolifération des cellules lorsqu'elles sont traitées avec ces inhibiteurs (X. Thomas & Elhamri 2005b).

- **Les études cliniques :**

L'inhibiteur le plus étudié est le tipifarnib (Zarnestra®, Johnson & Johnson). Un essai de phase I a été mené sur des patients atteints de leucémies aiguës en 2001 (J E Karp et al. 2001) donnant des résultats encourageants : 29% des patients ont répondu au traitement. Cette étude a montré qu'il n'y avait pas de relation dose-réponse puisque certaines rémissions complètes ont été observées même aux plus faibles doses. Des essais de phase II ont montré des effets anti-leucémiques observables mais faibles du Tipifarnib avec 14% de rémissions complètes et 9,5% de rémissions partielles dans une première étude concernant des patients âgés, nouvellement diagnostiqués et à pronostic défavorable (Jeffrey E Lancet et al. 2007) et 4% de rémissions totales ou partielles dans une autre étude de plus grande ampleur concernant des patients atteints d'une LAM réfractaire ou en rechute (J.-L. Harousseau et al. 2007). Enfin, une étude de phase III a été menée, comparant le tipifarnib et un traitement de support chez des patients âgés de plus de 70 ans et nouvellement diagnostiqués pour une LAM *de novo* ou secondaire (J.-L. Harousseau et al. 2009). Les résultats de cette étude randomisée ne montrent pas d'augmentation de la survie des patients traités par le tipifarnib par rapport aux patients traités par le traitement de support usuel.



Néanmoins, récemment un essai clinique de phase I a été conduit, combinant le tipifarnib et l'étoposide (un inhibiteur de topoisomérase II) pour le traitement de patients âgés de plus de 70 ans qui ne peuvent pas recevoir le traitement conventionnel. Cette étude a apporté des résultats prometteurs pour cette combinaison : 25% des patients ont atteint la rémission

complète (Judith E Karp et al. 2009). Les auteurs de cette étude suggèrent que les effets du tipifarnib sont médiés par l'inhibition de la farnésylation de Rheb (une molécule en amont de mTOR) plutôt que de celle de RAS.

Une étude de phase II randomisée a alors été menée afin de confirmer l'efficacité de la combinaison tipifarnib-étoposide : 25% des patients sont entrés en rémission complète mais des toxicités importantes ont été révélées (Judith E Karp et al. 2012).

Une demande de mise sur le marché pour le traitement des LAM chez les patients âgés a été faite en 2005 à la Food and drug administration (FDA) sans succès.

(ii) ANTI-MEK

Des inhibiteurs de MEK1/2, tels que PD98059 et PD184352 ont été évalués dans des études précliniques et ont montré une capacité d'inhibition de la croissance et de la survie des cellules LAM (Milella et al. 2001). Des inhibiteurs de MEK1/2 sont capables d'entrer en synergie avec d'autres thérapies ciblées comme BH3 mimétiques (M Konopleva et al. 2012). Une étude clinique d'un inhibiteur de MEK1/2, AS703026 (EMD Serono, division biopharmaceutique de MERCK), est en cours, évaluant l'efficacité de cet inhibiteur dans le traitement des hémopathies malignes dont les LAM (réf : NCT 00957580).

6. LES INHIBITEURS DU PROTEASOME

L'adressage au protéasome est la voie principale, de dégradation des protéines chez les eucaryotes, elle est indépendante des voies lysosomales. En effet, dans des conditions normales la voie lysosomale dégrade les protéines extracellulaires importées dans la cellule et le protéasome contrôle la dégradation des protéines intracellulaires (Almond & G. M. Cohen 2002). Le complexe du protéasome (26S) est constitué d'une partie catalytique (20S) et d'une ou deux parties régulatrices (19S). La partie 20S contient les sites actifs qui hydrolysent les peptides et la partie 19S est responsable de la reconnaissance des peptides et de leur linéarisation. En régulant l'homéostasie cellulaire par la dégradation les protéines qui ne sont plus nécessaires ou non fonctionnelles, le protéasome régule de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, il régule l'avancement dans le cycle cellulaire par la dégradation des cyclines et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines, il contrôle l'expression des gènes en dégradant des facteurs de transcription tels que NF- κ B, p53, c-Jun, c-Myc, c-Fos... Il est également impliqué dans la croissance cellulaire, la présentation des antigènes, l'angiogenèse et l'apoptose. Ces mécanismes influencés par le protéasome sont pour la plupart des mécanismes dérégulés dans les cancers. Cibler le protéasome par des thérapies cancéreuses est ainsi une des pistes innovantes dans le développement de nouveaux médicaments (Frankland-Searby & Bhaumik 2012).

– **Les études précliniques :**

Le bortezomib est le plus étudié des inhibiteurs du protéasome ; il inhibe de façon réversible l'activité « chymotrypsine-like » de ce dernier. Les mécanismes d'action de cette molécule sont très complexes (Di Raimondo & Conticello 2010) et peu décrites dans les LAM. Cependant, elle montre des actions anti-cancéreuses par induction de l'apoptose dans une grande variété de types cellulaires.

Elle induit l'apoptose en modifiant l'équilibre des protéines pro- et anti-apoptotiques :

- Bax et Bak : Le bortezomib entraîne un changement de conformation de Bax et Bak dans des cellules de lymphome du manteau (Pérez-Galán et al. 2006). Il n'induit pas d'augmentation des ARNm codant pour Bax ou Bak (H. Zhu et al. 2005) mais le protéasome régulant leur dégradation dans les cellules, son inhibition entraîne une accumulation de ces protéines (B. Li & Dou 2000). Dans les LAM, le co-traitement bortezomib et idarubicine entraîne l'accumulation de Bax (Pigneux et al. 2007).

- L'accumulation de Bim et de Bik semble aussi être un facteur important dans le mécanisme d'action des inhibiteurs du protéasome. L'inhibition du protéasome par le bortezomib induit l'accumulation de Bim permettant son interaction avec d'autres membres de la famille Bcl-2 notamment Bax/Bak et l'induction de l'apoptose (Fennell et al. 2008). Plusieurs études sur différentes lignées cellulaires, des lignées de cancers du poumon et de l'ovaire (H. Zhu et al. 2005) et des cellules de carcinome de la tête et du cou (C. Li et al. 2008) montrent que l'accumulation rapide de Bik est une constante dans les cellules traitées. De plus, l'inhibition de l'expression de Bik et de Bim entraîne la résistance au traitement par le bortezomib dans les lignées cellulaires de carcinomes de la tête et du cou (C. Li et al. 2008). Dans les LAM, le co-traitement bortezomib et bélinostat (un inhibiteur d'histone déacétylase) entraîne la régulation positive de Bim et son inhibition entraîne une apoptose moindre des cellules (Y. Dai et al. 2011). Le co-traitement de cellules de LAM avec le bortezomib et l'idarubicine entraîne également l'accumulation de Bim (Pigneux et al. 2007).

- La régulation positive de Noxa est aussi fréquemment observée dans les cellules traitées au bortezomib et son accumulation entraîne l'apoptose de plusieurs types de cellules : les cellules de myélome multiple, de cancers du poumon, de mélanome et de lymphome du manteau (C. Li et al. 2008) et dans les cellules leucémiques T, de cancer du sein (Fennell et al. 2008, p.2) . Cette accumulation est due à la fois à une diminution de la dégradation de la protéine et à l'augmentation de l'expression de son ARNm. Cette augmentation d'expression se fait selon un processus inconnu mais indépendant de p53 (même si la présence de p53 potentialise cette augmentation) (Fennell et al. 2008, p.2). L'inhibition de l'expression de Noxa dans ces cellules atténue la cytotoxicité du bortezomib confirmant son rôle dans l'apoptose des cellules traitées (Fennell et al. 2008, p.2).

- L'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, par augmentation de sa demi-vie cellulaire, est aussi une marque de l'inhibition du protéasome par le bortezomib. Les cellules qui surexpriment Mcl-1 sont ainsi résistantes au bortezomib (Fennell et al. 2008). Toutefois, un clivage de Mcl-1 par les caspases dans le processus d'apoptose induit par une inhibition du protéasome par le bortezomib a été récemment mis en évidence dans les cellules de myélomes multiples, réduisant la quantité de Mcl-1 dans la cellule et générant un fragment de 32 kDa ayant un rôle pro-apoptotique (B.-Z. Yuan et al. 2009). Une étude sur des cellules de patients atteints de LAM a montré que le traitement de ces cellules par le bortezomib induit une diminution de l'expression de Mcl-1 (Conticello et al. 2008).

- L'inhibition de Bcl-2 a été décrite dans certaines études mais ne semble pas être une caractéristique généralement observée (Fennell et al. 2008, p.2).

De façon cohérente avec les fonctions du protéasome, ces inhibiteurs ont aussi été décrits pour leur action sur l'inhibition du cycle cellulaire, de l'angiogenèse, des interactions cellule-cellule, de la migration cellulaire, des réponses inflammatoires et immunes, de la réparation de l'ADN (Frankland-Searby & Bhaumik 2012, p.26) et dans l'induction d'un stress cellulaire (Chunrong Yu et al. 2004).

Les voies mises en jeu sont :

- La voie NF- κ B : Un des premiers mécanismes d'action attribué aux inhibiteurs du protéasome est l'inhibition de NF- κ B via la stabilisation de son inhibiteur I κ B. NF- κ B régule de nombreuses voies cellulaires dont l'angiogenèse, la prolifération, la migration et la suppression de l'apoptose. Son activité est constitutive ou augmentée dans une grande variété de cellules tumorales. L'implication de la voie NF- κ B dans le mode d'action des inhibiteurs du protéasome est cependant controversée (D. J. McConkey & K. Zhu 2008). En effet, des études ont montré que le bortezomib n'inhibe pas la voie NF- κ B mais au contraire l'active dans des cellules de carcinomes de l'endomètre (Dolcet et al. 2006) et dans des cellules de myélomes multiples (Hideshima et al. 2009). Dans les LAM, un effet du bortezomib sur la méthylation des gènes a été montré via l'inhibition de NF- κ B. NF- κ B est capable d'interagir avec Sp1, une protéine à doigt de zinc qui régule l'activité du gène DNMT1 (qui code pour une ADN méthyltransférase) et l'active. La sur-activation de la voie NF- κ B dans les LAM entraîne ainsi une augmentation des complexes Sp1/NF- κ B, une augmentation de l'activité de DNMT1 et une augmentation de la méthylation des gènes. Le bortezomib est capable d'inhiber NF- κ B, de diminuer les niveaux d'expression de Sp1, d'empêcher l'association Sp1/NF- κ B et sa fixation au promoteur DNMT1 et finalement induit une hypométhylation globale de l'ADN (S. Liu et al. 2008).

- Le cycle cellulaire : L'inhibition du protéasome induit un arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt est dû à la dérégulation des cyclines et des inhibiteurs des kinases dépendante des cyclines (cdk) qui contrôlent normalement le cycle cellulaire. Ces protéines sont habituellement régulées par dégradation par le protéasome et l'inhibition de ce dernier

entraîne leur augmentation (Almond & G. M. Cohen 2002). L'accumulation de p27 a été observée dans les cellules HL60 en réponse à l'inhibition du protéasome (Drexler 1997).

- La voie de p53 : L'activation de p53, régulée par le protéasome dans les conditions normales, a été également envisagée comme une des voies d'induction de l'apoptose lors de traitement par le bortezomib (MacLaren et al. 2001). En effet, le bortezomib stabilise p53 et induit sa translocation cellulaire (mais n'induit pas sa phosphorylation) dans les cellules de cancer de la prostate (S. A. Williams & D. J. McConkey 2003). Mais une étude dans des lignées cellulaires leucémiques qui n'ont pas de p53 (telles que U937 et HL60) a montré que les inhibiteurs du protéasome étaient capables d'induire l'apoptose de la même manière dans ces cellules que dans les cellules non mutées pour p53 (An et al. 2000). Une autre étude dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate conclut également à une induction d'apoptose indépendante de p53 (J Adams et al. 1999). Ces études montrent donc que p53 n'est pas impliqué dans le mode d'action des inhibiteurs du protéasome, au moins dans certains types cellulaires.

- Production de ROS : Un autre mécanisme impliqué dans l'induction de la mort cellulaire par l'inhibition du protéasome est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette production de ROS semble critique au moins dans les cellules de lymphome du manteau puisque l'utilisation d'antioxydants bloque l'apoptose induite par le bortezomib (Pérez-Galán et al. 2006). Le mécanisme à l'origine de cette production de ROS est inconnu ; les hypothèses émises sont : l'altération des voies métaboliques d'oxydation-réduction, l'interférence avec la chaîne respiratoire ou le stress du réticulum endoplasmique dû à l'accumulation de protéines (Pérez-Galán et al. 2006). L'altération de la membrane mitochondriale par l'activation de la voie intrinsèque pourrait également expliquer la formation de ROS mais l'étude de P. Pérez-Galán montre que la production de ROS précède l'activation des caspases dans les cellules de lymphomes du manteau. Dans les cellules leucémiques, le traitement par le bortezomib entraîne la génération de ROS qui régulent les voies MAPK en activant JNK et en inhibant la voie ERK ce qui entraîne l'apoptose des cellules (Chunrong Yu et al. 2004).

L'accumulation des protéines dans la cellule entraîne également des toxicités notamment au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, ce dernier joue un rôle important dans le repliement des protéines et dans leur maturation. Les protéines mal repliées ou non repliées sont adressées au protéasome pour dégradation et l'inhibition du protéasome entraîne une accumulation et l'agrégation de protéines dans le réticulum. Cela provoque un stress et entraîne l'activation de la voie de « réponse aux protéines non repliées » (*Unfolded Protein Response* ou UPR). Cette voie est au départ une voie de survie puisqu'elle entraîne l'expression de protéines chaperonnes pour limiter l'agrégation des protéines, l'augmentation de la synthèse des composants du réticulum endoplasmique et la limitation de la synthèse protéique. Mais, si l'inhibition du protéasome persiste cette voie se transforme en voie pro-apoptotique (Obeng 2006).

- La voie PI3K/Akt : Des études récentes impliquent la voie PI3K/Akt/mTOR dans les conséquences de l'inhibition du protéasome. Une étude montre que les voies

PI3K/Akt/mTOR et MAPK sont inhibées en présence de bortezomib dans des cellules de cancer de la prostate et que cette inhibition entraîne la répression de l'expression de HIF-1 α participant ainsi à la diminution de la tumeur (Befani et al. 2012). Une équipe vient de montrer une inhibition des voies PI3K/Akt/mTOR à la fois au niveau de la phosphorylation et de l'expression protéique en réponse au bortezomib dans le lymphome du manteau (Hutter et al. 2012).

- Les voies en aval de c-Kit : Le bortezomib semblerait avoir des effets pro-apoptotiques particuliers sur les LAM portant l'anomalie t(8;21) ; RUNX1/ETO et qui portent des mutations activatrices de c-Kit. En effet, dans ces cellules le bortezomib induit l'apoptose via l'internalisation du récepteur c-Kit. Ce récepteur est alors capable de lier et phosphoryler la protéine chaperonne Hsp90 β (*Heat shock protein 90*) ce qui a pour effet d'augmenter sa capacité à séquestrer Apaf-1. Ainsi, c-Kit a un rôle anti-apoptotique en inhibant l'activation de la caspase 9. L'action du bortezomib consiste alors à déphosphoryler Hsp90 β , ce qui entraîne la libération d'Apaf-1, l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3. Celle-ci clive alors la protéine de fusion RUNX1/ETO ce qui provoque la génération de fragments perturbant l'action oncogénique de RUNX1/ETO et contribue à l'apoptose (H.-T. Fang et al. 2012).

De nombreux autres modes d'action ont été suggérés, ils sont listés dans la revue de William Ka Kei Wua en 2010 (W. K. K. Wu et al. 2010).

Ainsi, les modes d'action du bortezomib ne sont pas encore totalement définis et semblent impliquer de nombreuses voies cellulaires. Cependant, il est maintenant établi que les cellules tumorales sont plus sensibles que les cellules normales à cet inhibiteur. Les mécanismes impliqués dans cette spécificité ne sont pas encore complètement déterminés mais il a été suggéré que les cellules malignes soient dépendantes du protéasome pour la dérégulation des voies de prolifération et d'inhibition de l'apoptose. En effet, les cellules tumorales prolifèrent de façon exacerbée et ont donc un grand besoin de synthèse protéique ce qui les rend vulnérables à l'inhibition du protéasome (Crawford et al. 2011). Dans les leucémies aiguës myéloblastiques il a été montré une corrélation entre une quantité importante de sous-unités 20S du protéasome et la grande sensibilité aux inhibiteurs (Matondo et al. 2010).

– Les études cliniques :

Le bortezomib est le seul inhibiteur du protéasome aujourd'hui utilisé en clinique (sous le nom de Velcade® et développé par Janssen Cilag international). Le bortezomib est indiqué dans le traitement des rechutes de myélomes multiples et dans le lymphome du manteau. Malgré son efficacité dans le traitement de ces hématopathies, les résultats des essais cliniques sur les tumeurs solides sont assez décevants et des résistances innées et acquises ont également été décrites sans que le mécanisme de ces résistances soit élucidé. Concernant les LAM, plusieurs essais cliniques ont été menés. Une première étude évaluant la dose efficace et les toxicités lors de l'administration du bortezomib seul chez des patients atteints de leucémies aiguës réfractaires ou en rechute. Quinze patients ont été inclus dans l'étude, 5 patients parmi eux ont eu une amélioration au niveau hématologique (diminution du nombre

de blastes pour 4 patients et augmentation des neutrophiles pour un patient). La dose maximale tolérée était de $1,25\text{mg/m}^2$ (Cortes et al. 2004).

Des études de l'efficacité du bortezomib en combinaison avec d'autres agents ont également été conduites. Une étude associant le bortezomib et la doxorubicine liposomale pegylée (forme encapsulée dans un liposome de la doxorubicine (une anthracycline)) pour le traitement de patients avec hémopathies malignes avancées a entraîné 8 rémissions complètes et 8 rémissions partielles chez les 22 patients participant à l'étude. L'association est bien tolérée, notamment aux doses de $1,30\text{mg/m}^2$ de bortezomib et 30mg/m^2 de doxorubicine liposomale pegylée (Orlowski et al. 2005). Une étude combinant bortezomib plus tipifarnib (inhibiteur de farnésyltransférases) chez des patients avec une leucémie aiguë avancée a montré seulement des résultats modestes : seuls deux patients sur les 27 inclus dans l'étude ont atteint une rémission complète, sans retour à un compte cellulaire normal (Jeffrey E Lancet et al. 2011). La combinaison est bien tolérée et une inhibition de l'activité farnésyltransférase, de l'activité chymotrypsine du protéasome et une inhibition de la voie NF- κ B ont été observées chez une majorité des patients (Jeffrey E Lancet et al. 2011). Un essai clinique avec le bortezomib et l'idarubicine et la cytarabine a été mené chez des patients atteints de LAM. Sur les trente-un patients participants, 19 ont atteint la rémission complète et 3 ont eu une rémission complète sans retour à un compte plaquettaire normal. Les doses sont bien tolérées (Attar et al. 2008). Basé sur l'étude de Liu et al (S. Liu et al. 2008) montrant que le bortezomib est capable d'induire une hypométhylation de l'ADN via inhibition de gènes codant pour les enzymes ADN méthyltransférases dans les cellules de LAM, un essai clinique a été mené associant le bortezomib et la décitabine (un traitement hypométhylant). Dix-neuf patients ont été inclus dans l'étude, 7 patients ont atteint une rémission complète avec ou sans retour à un compte de cellules sanguines normal. Des toxicités neurologiques ont été observées après plusieurs cycles d'induction avec le bortezomib (W. Blum et al. 2012).

De plus, de nombreux essais cliniques sont en cours ; 14 études dont 2 évaluent l'efficacité du bortezomib seul et 12 études en combinaison avec d'autres molécules (midostaurine, sorafenib, belinostat, nelfinavir...) ou avec des chimiothérapies conventionnelles.

Une étude combinant le bortezomib avec le vorinostat a été interrompue pour cause d'extrême toxicité (réf : NCT00818649).

Le bortezomib semble ainsi être une molécule prometteuse dont les modes d'action doivent être précisés. D'autres inhibiteurs du protéasome liant de façon irréversible le protéasome ont été développés et étudiés dans les hémopathies malignes ; il s'agit du carfilzomib et de la salinosporamide A.

b) CARFILZOMIB

Le carfilzomib (Kyprolis®) est peptide dérivé de l'époxomycine (un inhibiteur naturel du protéasome) développé par Onyx Pharmaceuticals. Il inhibe de façon irréversible, efficace et sélective l'activité « chymotrypsine-like » du protéasome (Ruschak et al. 2011). Dans les cellules de myélomes multiples, le carfilzomib induit une inhibition de prolifération de façon dépendante de la dose et du temps et entraîne leur apoptose (Fuchs et al. 2009). Cette mort cellulaire est associée avec l'activation de JNK et des voies extrinsèque et intrinsèque de

l'apoptose (Fuchs et al. 2009). Il a reçu, très récemment (Juillet 2012), l'autorisation de mise sur le marché en traitement de troisième intention chez les patients atteints de myélome multiple.

Cette molécule est en cours d'évaluation dans un essai de phase I chez des patients en rechute de LAM (réf : NCT01137747).

c) SALINOSPORAMIDE A

Le salinosporamide A est un produit naturel isolé de *Salinispora tropica* (bactérie marine). Il inhibe les trois activités du protéasome (« chymotrypsine-like », « trypsine-like » et « caspase-like »). Dans les cellules leucémiques, le salinosporamide A entraîne la génération de ROS, l'activation de la caspase 8, le clivage de Bid et l'induction de la voie mitochondriale (C. P. Miller et al. 2007). Une étude clinique de phase I, menée par Nereus pharmaceuticals, est en cours évaluant la toxicité et la pharmacodynamique de cette molécule chez des patients atteints d'hémopathies avancées (réf : NCT00629473).

7. LES MODULATEURS MDR

La glycoprotéine P est une protéine membranaire codée par le gène MDR1 et qui appartient à la superfamille des protéines ABC (*ATP-Binding Cassette proteins*). Elle permet aux cellules normales et tumorales d'effluer des molécules toxiques, notamment des molécules utilisées en chimiothérapie, hors de leur compartiment. La surexpression de la P-gP est un mécanisme de résistance aux traitements important dans les LAM et est associé à un pronostic défavorable (C. S. Wilson et al. 2006). Plusieurs modulateurs de cette P-gP ont donc été évalués, tout d'abord la cyclosporine A et la quinine. L'utilisation de la cyclosporine A en addition avec une chimiothérapie d'induction conventionnelle chez des patients en rechute ou atteints de LAM réfractaires a montré un bénéfice de survie pour ces patients (List et al. 2001). Cependant, une autre étude a été menée et n'a pas confirmé ces résultats ; aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes recevant la cyclosporine et les groupes n'en recevant pas (Daenen et al. 2004). Concernant la quinine, une étude a montré une augmentation du taux de rémission complète chez certains patients traités mais pas d'amélioration de la survie globale (Solary et al. 2003). Des inhibiteurs de deuxième et troisième générations ont alors été développés : le valspodar (PSC-833) et le zosuquidar (LY335979).

a) VALSPODAR

Deux études randomisées ont été menées pour évaluer le bénéfice de l'ajout de valspodar (Ambray®), à la chimiothérapie d'induction chez des sujets âgés. Dans une première étude, un groupe a reçu une chimiothérapie composée de cytosine arabinoside, de daunorubicine et d'étoposide et un autre groupe la même combinaison de molécules supplémentée avec du valspodar. Cette étude a été interrompue de façon prématurée à cause de mortalités causées

par le traitement et d'un manque d'efficacité (Baer et al. 2002). Dans une deuxième étude, la comparaison de l'administration de cytarabine et de daunorubicine avec ou sans ajout de valspodar n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes (van der Holt et al. 2005). Dans une large étude incluant 1273 patients atteints de LAM et de SMD à haut risque comparant plusieurs traitements dont l'ajout de valspodar à la daunorubicine, une tendance à une réponse inférieure dans le groupe traité par le valspodar a même été observée à cause d'un taux de mortalité plus élevé dans ce groupe (A. K. Burnett et al. 2009). Enfin, une étude randomisée a été menée afin d'évaluer le bénéfice de ce traitement chez des patients jeunes, malheureusement aucun bénéfice n'a été observé dans le groupe recevant du valspodar (Kolitz et al. 2010).

b) ZOSUQUIDAR

Zosuquidar est la troisième génération de modulateur de P-gp. Il est plus spécifique que les modulateurs de première et deuxième générations c'est-à-dire que la cyclosporine A et que le valspodar. En effet, ces molécules, en plus de la modulation de la P-gp, interagissent avec l'activité du cytochrome P450 3A4 et ainsi modifient les profils pharmacocinétiques des agents chimiothérapeutiques co-administrés (Ferrara 2012). Le zosuquidar n'entraîne pas d'interaction pharmacologique et ainsi les doses standard de chimiothérapie peuvent être administrées en association avec cette molécule sans risque de toxicité (R. Tang et al. 2008). Une étude a montré que le zosuquidar est capable de restaurer la sensibilité des cellules exprimant la P-gp à certaines chimiothérapies (anthracyclines et GO) (R. Tang et al. 2008). Deux études de phase I ont montré que le zosuquidar pouvait être administré sans toxicité en combinaison avec la daunorubicine et la cytarabine ou avec la doxorubicine (Gerrard et al. 2004) (Sandler et al. 2004). Néanmoins, une étude de phase III évaluant les combinaisons cytarabine, daunorubicine et zosuquidar ou placebo chez 449 patients âgés atteints de LAM ou de MDS à haut risque n'a pas montré de bénéfice de l'administration de zosuquidar (Cripe et al. 2010).

L'APPORT DES COMPOSES NATURELS

Les produits naturels sont très présents dans les thérapies anticancéreuses ; parmi les composés actuellement utilisés en clinique, 14% sont d'origine naturelle et 28% correspondent à un produit naturel modifié (C Monneret 2010). Après une période de grand développement des molécules d'origine naturelle, qui a apporté des traitements tels que la doxorubicine, la daunorubicine (anthracyclines d'origine bactérienne découvertes dans les années 1970, toujours utilisées actuellement), une période de désintérêt pour les substances naturelles est observée dans les années 1990 (Christian Bailly 2009). Ce désintérêt était dû au développement de la chimie combinatoire et des criblages haut débit qui ont laissé espérer la possibilité de créer une molécule pour une cible. Si cet objectif reste d'actualité, les progrès sont lents et des résistances se développent entraînant la nécessité de découvrir de nouvelles molécules (Christian Bailly 2009). Cela a entraîné un regain d'intérêt pour les produits

naturels et depuis 2007, 4 molécules d'origine naturelle ont été développées (Christian Bailly 2009) (C Monneret 2010) :

- Trabectédine (Yondelis®), un produit d'origine marine qui entraîne une alkylation des guanines du petit sillon de l'ADN indiqué dans le sarcome avancé des tissus mous en traitement de deuxième intention.
- Ixabepilone (Ixempra®), d'origine bactérienne, ce macrolide entraîne une stabilisation des microtubules et est indiqué dans les cancers du sein métastatiques ou avancés.
- Temsirolimus (Torisel®) et évérolimus (Affinitor®), dérivés de la rapamycine, d'origine bactérienne, ces macrolides entraînent l'inhibition de mTOR. Ces molécules sont actuellement en développement pour le traitement des LAM et suscitent de nombreux espoirs (voir paragraphe inhibiteurs de mTOR p 89).

Diverses molécules extraites de végétaux sont actuellement en cours d'évaluation préclinique pour le traitement des LAM. Le tableau suivant résume les études des 4 dernières années réalisées sur ce type de composés dans des modèles de LAM. Il a été conçu à partir d'une recherche bibliographique pubmed : « *antineoplastic agents/phytogenic and acute myeloid leukemia* ».

Famille	Origine	Effets in vitro	Effets in vivo	Réf	Année
Allium					
Thiosulfates (Dipropylthiosulfate Diméthylthiosulfinate)	Ail, Oignon, poireau...	Anti-prolifératifs Induisent la différenciation cellulaire Modèles : U937, HL60, NB4 et MM6		(Merhi et al. 2008)	2008
Disulfures					
Diallyl disulfure	Ail, Oignon, poireau...	Induit l'apoptose des cellules via l'inhibition de ERK et l'activation de p38MAPK Modèle : HL60		(Tan et al. 2008)	2008
Polyphénols					
Flavonoïdes					
Wogonine	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Induit l'apoptose mitochondriale en diminuant l'expression de Bcl-2 et en diminuant l'activité télomérase de hTERT Modèle : HL60		(S.-T. Huang et al. 2010)	2010

Kaempferol	Plantes (aubépine, ortie, thé...) Fruits (cassis, myrtille...)	Induit l'apoptose mitochondriale en diminuant l'expression de Bcl-2 et en augmentant l'expression de Bax Inhibition de PI3K/Akt Modèles : U937 et K562	(Marfe et al. 2009)	2009	
Quercetine	Fruits (myrtille, cassis, cerise, pomme...) et légumes (piment, brocolis, oignon...)	Induit l'apoptose mitochondriale en diminuant l'expression de Mcl-1 et en activant Bax Modèle : U937	Réduction de la tumeur induite par une xénogreffe de U937 chez la souris	(S. Cheng et al. 2010)	2010
Naringénine	Agrumes	Anti-prolifératif Induit l'apoptose mitochondriale Inhibition de la voie PI3K/Akt Modèle : THP1	(J. H. Park et al. 2008)	2008	
(-)-Épigallocatechine 3-gallate	Thé vert	Induit l'apoptose via la diminution de l'expression de Bcl-2	(D. H. Han & J. H. Kim 2009)	2009	
Stilbènes					
Resveratrol	Fruits (raisin, grenade...) et plantes (Rhubarde, plantes médicinales chinoises...)	Antiprolifératif, Induit l'apoptose des cellules en diminuant l'expression de Bcl-2, augmentant l'expression de Bax, de la caspase 3, de l'annexine A1 et de GADD45α Modèle : HL60	(G. Li et al. 2011)	2011	
Coumarine					
Esculetin	Aesculus hippocastanum	Induit l'apoptose mitochondriale en activant les voies ERK et JNK Modèle : U937	(C. Park et al. 2008)	2008	
Terpènes					
Kahweol	Café	Induit l'apoptose mitochondriale en diminuant l'expression de Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 et XIAP Inhibe Akt et MAPK Modèle : U937	(J. H. Oh et al. 2009)	2009	
Tanshinone II A	<i>Radix salvia miltiorrhiza</i>	Induit une différenciation et l'apoptose des cellules via CEBPβ Modèles : NB4 et MR2	(K. Zhang et al. 2010)	2010	

Acide ursolique	Nombreuses plantes (Romarin, sauge, sureau, thym, basilic...)	Induit la différenciation des cellules en augmentant l'expression de CEBPβ Modèle : HL60	(T. Zhang et al. 2011)	2011	
Adenanthine	R.adenantha	Induit la différenciation des cellules en augmentant le taux cellulaire H2O2 et en augmentant l'expression de CEBPβ Modèle : NB4	Réduction de la tumeur dans des souris xénogreffées et prolonge leur survie	(C.-X. Liu et al. 2012)	2012
Oridonine	Rabdosia rubescens	Cible spécifiquement les cellules t(8;21) et induit leur apoptose en clivant AML1-ETO. Ce clivage est dû à l'augmentation des ROS qui entraînent l'action de la caspase 3	(Zhen et al. 2012)	2012	
3-hydrogenkwadaphnine	Dendrostellera lessertii	Inhibe la prolifération des cellules en induisant leur différenciation	(Yazdnparast & Meshkini 2009)	2009	

Lactones

Lactones Stéroïdes

Withaferine	<i>Withania somnifera</i>	Induit l'apoptose en inhibant l'activité d'Akt et l'expression de XIAP	(J. H. Oh et al. 2008)	2008
--------------------	---------------------------	--	------------------------	------

Lactones

sesquiterpéniques

6-O-angeloylenolin	<i>Centipeda minima</i>	Induit l'apoptose des cellules via la production de ROS, l'inhibition de NF- κ B et la modulation de l'expression des gènes de la famille Bcl-2	(Changlong et al. 2008)	2008
---------------------------	-------------------------	--	-------------------------	------

Parthénolide	<i>Tanacetum parthenium</i>	Induit l'apoptose des cellules souches leucémiques et des cellules LAM exprimant la MPO de façon importante en inhibant NF-κB, Bcl-xl, Mcl-1, XIAP et la survivine Modèles : U937, K562, HL60, Kasumi-1, NB4, KG1, OCI-AML3, and MOLM13	Diminue la capacité des cellules exprimant fortement la MPO à former des tumeurs chez des souris NOD/SCID	(Y. R. Kim et al. 2010)	2010
Ester phényléthylique de l'acide caféique	<i>Propolis</i>	Induit l'apoptose mitochondriale en diminuant l'expression de Bcl-2, augmentant l'expression de Bax Modèle : U937		(U.-H. Jin et al. 2008)	2008
Xanthones					
1-hydroxy-3,7,8 triméthoxyxanthone	<i>Gentianopsis paludosa Ma</i>	Induit un arrêt de prolifération à faible dose et une apoptose à plus forte dose Modèle : HL60		(Lan Ding et al. 2009)	2009
Mangiférine	Mangue, feuilles de caféier	Induit l'apoptose en inhibant l'activité de NF-κB et l'expression de Bcl-xl et XIAP Modèle : HL60		(Shoji et al. 2011)	2011
Naphtoquinone					
Plumbagine	<i>Plumbago zeylanica</i>	Induit l'apoptose mitochondriale via la génération de ROS Modèle : NB4	Réduction de la tumeur dans la souris NOD/SCID	(K.-H. Xu & D.-P. Lu 2010)	2010
Dérivés des 2-pyrones					
5-bromo-3-(3-hydroxyprop-1-ynyl)-2H-pyran-2-one	<i>Synthétique mais motif 2-pyrone présent dans beaucoup de produits naturels</i>	Induit une diminution de l'expression des kinases dépendantes des cyclines, induit l'apoptose des cellules en augmentant l'expression de Bax, l'activation de la caspase 8 et la diminution de Bcl-2. Les voies PI3K/Akt et NF-κB sont inhibées. Modèle : HL60, WEHI-3BD ⁺ , cellules LAM primaires	Prolonge la survie des souris BALB/c greffées avec des cellules WEHI-3BD ⁺	(J. S. Yoon et al. 2012)	2012

Un exemple d'un produit d'origine végétale, aujourd'hui en développement avancé pour les LAM est le flavopiridol. Le flavopiridol ou Alvocidib® (Sanofi Aventis) est une flavone semi-synthétique extraite des plantes *Amoora rahituka* et *Dysoxylum binectariferum*, utilisées en médecine traditionnelle en Inde. Il fait partie de la famille des flavonoïdes, une des plus grandes familles de produits naturels et semblent avoir des effets sur différentes pathologies telles que des cancers, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (Fathi et al. 2010). La plupart des actions des flavonoïdes ont été attribuées à leurs propriétés antioxydantes mais de récentes études montrent que ces flavonoïdes peuvent interagir avec des protéines de signalisation notamment avec des protéines kinases telles qu'Akt, JAK, MAPK... (D.-X. Hou & Kumamoto 2010).

– Etudes précliniques :

Le flavopiridol induit l'apoptose de nombreuses lignées cellulaires leucémiques et a plusieurs modes d'action (Nelson et al. 2011).

- Il inhibe les kinases dépendantes des cyclines (cdk) et arrête ainsi le cycle cellulaire. Il inhibe toutes les cdk de façon compétitive pour la fixation de l'ATP (la partie benzopyranone du flavopiridol occupant le site de fixation de l'ATP dans les cdk) (Lansiaux & C Bailly 2000).

- Il inhibe cdk7 et cdk9 ce qui entraîne une inhibition de la phosphorylation et de l'activation de l'ARN polymérase II. En effet, cdk7 et cdk9 sont capables de phosphoryler le domaine carboxyterminal de l'ARN polymérase II, ce qui facilite l'initiation de la transcription et ensuite l'élongation. Leurs inhibitions entraînent donc une diminution globale de l'expression des gènes et ont un impact, notamment, sur l'expression d'ARNm à durée de vie courte tels que ceux codant pour des protéines pro-apoptotiques et des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (G. I. Shapiro 2006). Ainsi, des inhibitions d'expression de la cycline D1, de Mcl-1 et de Bcl-2 ont été observées.

- Il inhibe la fixation de STAT3 sur l'ADN, et ainsi inhibe l'activation de la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la survie. STAT3 est constitutivement actif dans les LAM (Y. K. Lee et al. 2006) (voir paragraphe JAK/STAT p 62).

– Les études cliniques :

Le flavopiridol ciblant les cellules en cycle et celles qui sont quiescentes, des combinaisons avec des chimiothérapies telles que la cytarabine qui ciblent des cellules en cycle, ont été évaluées. Cependant, le flavopiridol entraînant un arrêt de prolifération des cellules ces essais n'ont pas été concluants (Fathi et al. 2010). Une stratégie a émergé pour augmenter l'efficacité des agents dépendants du cycle : la thérapie séquentielle. Cette stratégie repose sur l'idée que l'administration d'une molécule initiale induit une mort cellulaire d'une partie des cellules tumorales et que le retrait de cette molécule induit ensuite un retour en cycle des

cellules malignes restantes et ainsi les sensibilisent à une molécule dépendante du cycle (Judith E. Karp et al. 2003).

Ainsi des essais cliniques combinants le **FL**avopiridol puis la cytarabine (Ara-C) et la **M**itoxanthrone (FLAM) ont été menés. Une première étude de phase I (Judith E Karp et al. 2005) évaluant l'efficacité de cette combinaison a concerné 26 patients atteints de LAM en rechute ou réfractaires. Parmi eux 8 patients (31%) ont répondu au traitement dont 6 par une rémission complète et 2 par une rémission partielle. Des toxicités de grade 2 et 3 ont été observées après l'administration du flavopiridol.

Une étude de phase II a ensuite été menée chez 62 patients atteints de LAM avec pronostic défavorable. Des rémissions complètes ont été observées chez 12 des 15 patients nouvellement diagnostiqués pour une LAM secondaire (75%), 18 des 24 patients en première rechute (75%) mais seulement 7,5% dans les cas de LAM réfractaires (Judith E Karp et al. 2007). Une étude randomisée de comparaison du traitement FLAM avec des chimiothérapies conventionnelles cytarabine et daunorubicine (réf : NCT01413880) est en cours, ainsi qu'une autre étude comparant FLAM avec deux combinaisons : carboplatine, topotécan et sirolimus, mithoxanthone, étoposide, cytarabine (réf : NCT00634244).

Des études du flavopiridol avec d'autres molécules ont également été menées notamment une association avec vorinostat (réf : NCT00278330) et une autre en combinaison avec l'imatinib (réf : NCT00064285) dont les résultats n'ont pas encore été communiqués.

Objectifs de la thèse :

Nous avons vu dans cette première partie introductive que les anomalies retrouvées dans les LAM ont mené au développement de thérapies ciblées contre ces anomalies. Nous avons également vu que de nombreux produits d'origine naturelle sont actuellement en cours de développement préclinique dans les leucémies aiguës myéloblastiques. C'est dans le contexte de ces traitements innovants que s'inscrit mon travail de thèse.

Je me suis ainsi intéressée à plusieurs molécules dérivées de l'acide flavone-8-acétique (FAA). Deux études principales ont été menées : une concernant l'acide 2',3-Dinitroflavone-8-acétique (DNFAA) et l'autre la 3,3'-Diamino-4'-méthoxyflavone (DD1). La première étude compare les effets du DNFAA, inhibiteur de l'aminopeptidase APN/CD13, et les anticorps dirigés contre cet antigène dans les LAM (Article 1). La deuxième étude analyse les effets de DD1 dans les LAM (Article 2). Plusieurs autres molécules ont été étudiées mais les résultats sont encore préliminaires. Deux nitrochromanes ont notamment été étudiées et ont été montrées comme capables d'entraîner l'apoptose des lignées LAM et des cellules primaires de patients. Les caractéristiques de l'apoptose induite restent à déterminer.

Enfin, lors d'un travail de collaboration, j'ai participé à l'analyse des effets d'un thiosulfinate : l'hyperforine (voir annexe).

L'évaluation de ces molécules est faite à un stade préclinique avec des études sur les lignées cellulaires et sur des prélèvements sanguins de patients leucémiques. Les objectifs de ces études étaient de définir de nouvelles cibles pharmacologiques dans les LAM en évaluant l'intérêt thérapeutique potentiel de ces molécules capables de restaurer les processus apoptotiques déficients dans les LAM. Ainsi, les études portent sur la caractérisation de l'apoptose induite par ces molécules et particulièrement sur leurs effets sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et les voies de signalisation impliquées.

PARTIE 2 - RÉSULTATS

Article 1 :
***L'aminopeptidase-N/CD13 est une cible
pro-apoptique potentielle dans les cellules
tumoraales myéloïdes***

L'AMINOPEPTIDASE-N/CD13 EST UNE CIBLE PRO-APOPTIQUE POTENTIELLE DANS LES CELLULES TUMORALES MYELOÏDES

I. INTRODUCTION

La protéase aminopeptidase-N (APN/CD13) est une métalloprotéase intrinsèque de la membrane plasmique possédant un domaine extracellulaire composé d'une région contenant le site catalytique de l'enzyme. Plusieurs isoformes de CD13 ont été mises en évidence, reflétant des variations en glycosylation de la protéine.

L'expression constitutive de cette protéase varie énormément selon les tissus et les types cellulaires considérés. Elle est détectable sur les cellules épithéliales (rein, entérocytes, système nerveux central), les fibroblastes et dans le système hématopoïétique sur les cellules du lignage granulocyte-monocyte, les cellules souches CD34⁺CD38⁻, les progéniteurs myéloïdes CD34⁺CD38⁺ et les cellules dendritiques myéloïdes matures. Les lymphocytes T/B normaux ainsi que la vascularisation normale n'expriment pas CD13. Des formes solubles sont présentes dans les plasma/sérum et urine mais le mécanisme de libération de la forme membranaire de CD13 n'est pas connu.

APN/CD13 est anormalement induite ou surexprimée dans des maladies inflammatoires (comme l'arthrite rhumatoïde et la sclérose multiple), dans certaines tumeurs solides (rein, mélanome, sein, prostate) et hématologiques comme les leucémies myéloïdes, aiguës et chroniques et la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) (Bauvois & Dauzonne 2006)

Bien que l'ARNm de CD13 soit présent dans les cellules vasculaires endothéliales (Fukasawa et al. 2006), seules les cellules endothéliales jouxtant les tumeurs solides expriment la protéine à leur surface (R Pasqualini et al. 2000)

Par le métabolisme d'hormones plasmatiques (angiotensine III, encéphaline, somatostatine, et neurokinine A), APN/CD13 participe à divers processus physiologiques (perméabilité vasculaire, neurotransmission, sécrétion digestive, réponse inflammatoire). Cette protéase est aussi directement impliquée dans la protéolyse de chimiokines (MCP-1, MIP-1) et pourrait agir sur des composants de la matrice extracellulaire déjà clivés par d'autres endoprotéases comme la plasmine ou la matrix metalloproteinase-9 et ainsi contribuer à la cascade du mécanisme d'invasion des cellules tumorales (Bauvois & Dauzonne 2006) (D Riemann et al. 1999).

Initialement, les expériences visant au blocage de CD13 par différentes approches comme l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité enzymatique, d'anticorps, et d'antisens a permis de suggérer que CD13 pourrait participer à la progression tumorale et à l'angiogenèse associée en agissant sur les cellules endothéliales et sur les cellules tumorales (Bauvois & Dauzonne 2006). L'inhibition in vitro de CD13 dans des modèles de tumeurs est accompagnée par un blocage de la prolifération, de la capacité invasive et de la sécrétion en cytokines (IL-6, IL-8) (Bauvois & Dauzonne 2006). Les antagonistes d'APN/CD13 (bestatine, amastatine, anti-CD13 : WM15 et MY7) abrogent la capacité des cellules endothéliales à former un réseau capillaire (formation des tubes) sans cependant altérer leur capacité proliférative (R Pasqualini et al. 2000), (Bhagwat et al. 2001), (Hashida et al. 2002), (Bauvois & Dauzonne 2006).

Des observations plus récentes dans le modèle de souris avec le gène éteint pour CD13 indiquent que ces souris sont viables et se développent normalement, sans altérations cardiovasculaire, neurologique, métabolique et hématologique (Rangel et al. 2007),(Winnicka et al. 2010). Ces souris ont une hématopoïèse normale et une fonction normale des cellules myéloïdes (phagocytose, présentation d'antigènes) (Winnicka et al. 2010). CD13 n'apparaît pas essentielle pour la vasculogénèse (formation de novo des vaisseaux sanguins) et l'angiogénèse physiologique (formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants). Cette dernière observation suggère qu'il existe probablement d'autres substrats angiogéniques que l'angiotensine IV issue de la dégradation de l'angiotensine III par CD13 (Rangel et al. 2007). Cependant l'absence de CD13 réduit fortement la réponse angiogénique à l'hypoxie (néovascularisation de la rétine après hypoxie) soulignant le rôle de CD13 dans l'angiogénèse pathologique (Rangel et al. 2007).

Même si CD13 ne semble pas contribuer directement au développement hématopoïétique et à la fonction des cellules myéloïdes, elle reste une molécule d'intérêt thérapeutique. En effet dans le cadre du développement de nouvelles thérapies anti tumorales, des recherches sont orientées vers le ciblage d'antigènes tumoraux qui pourraient déclencher des signaux intracellulaires conduisant au blocage de la prolifération ou à l'induction d'apoptose. CD13 étant surexprimé dans les LAM, il pourrait représenter une cible potentielle.

L'efficacité des inhibiteurs de l'activité enzymatique d'APN reste cependant, pour la plupart, limitée et contrastée du fait de leur cytotoxicité et spécificité non restreinte à CD13. Ainsi, les essais cliniques impliquant la bestatine pour le traitement de leucémies myéloïdes aiguës et chroniques (LAM et LMC) n'ont pas été poursuivis en raison de la cytotoxicité élevée de cette molécule et de son manque de spécificité restreinte à CD13 (Bauvois & Dauzonne 2006).

La collaboration entre les groupes de recherche de Brigitte Bauvois et de Daniel Dauzonne (Institut Curie, CNRS UMR 176) s'est articulée autour d'un axe principal émanant de la synthèse de dérivés flavoniques originaux (D. Dauzonne) et le rôle de CD13 dans les cellules de LAM (B. Bauvois). En 2004, ils ont identifié une molécule non cytotoxique (acide 2',3-Dinitroflavone-8-acétique/DNFAA) en tant qu'inhibiteur d'APN/CD13. Cette molécule est maintenant commercialisée par EMD Biosciences Inc (San Diego, CA) (revendeur Calbiochem n°164602).

Le but de notre travail a été de rechercher si l'inhibition de CD13 par DNFAA et/ou sa ligation par des anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de CD13 pourraient affecter la prolifération et la survie des cellules leucémiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans The FASEB Journal en 2011.

Aminopeptidase-N/CD13 is a potential pro-apoptotic target in human myeloid tumor cells

Marion Piedfer^{*,#,\$}, Daniel Dauzonne^{\$}, Ruoping Tang^Π, Juliette N’Guyen[□], Christian Billard^{*,#,\$}, and Brigitte Bauvois^{*,#,\$,1}

^{*}Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U872, Equipe 18, Paris, France;

[#]Université Pierre et Marie Curie, UMRS 872; Paris, France;

^{\$}Université Paris-Descartes, UMRS 872, Paris, France;

^{\$}CNRS 176, Institut Curie, Paris, France;

^ΠDépartement d’Hématologie, Hôpital St Antoine, Paris, France;

[□]Département Maladies Infectieuses, Hôpital Cochin, Paris, France.

¹Correspondence: Centre de Recherche des Cordeliers INSERM U872, 15 rue de l'Ecole de Médecine, F-75270 Paris cedex 06, France. E-mail: brigitte.bauvois@crc.jussieu.fr

Short title: CD13 targeting in human myeloid leukemia

ABSTRACT

The transmembrane metalloprotease aminopeptidase-N (APN)/CD13 is overexpressed in various solid and hematological malignancies in humans including acute myeloid leukemia (AML) and is thought to influence tumor progression. We sought to investigate the contribution of APN/CD13 to the regulation of growth and survival processes in AML cells *in vitro*. Anti-CD13 monoclonal antibodies MY7 and SJ1D1 (which do not inhibit APN activity) and WM15 (an APN-blocking antibody) inhibited the growth of the AML cell line U937 and induced apoptosis, as evidenced by cell accumulation in the sub-G1 phase, DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization. Isotype-matched IgG1 and the APN/CD13 enzymatic inhibitors bestatin and 2',3-dinitroflavone-8-acetic acid, were ineffective. Internalization of CD13-MY7 complex into cells was followed by mitochondrial membrane depolarization, Bcl-2 and Mcl-1 downregulation, Bax upregulation, caspase-9,-8 and -3 activation and cleavage of the caspase-3 substrate PARP-1. The broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk and the caspase-9- and -8-specific inhibitors significantly attenuated apoptosis. CD13 ligation also induced apoptosis and PARP-1 cleavage in primary AML blasts, whereas normal blood cells were not affected. Overall, these data provide new evidence that CD13 can serve as a target for inducing caspase dependent-apoptosis in AML (independently of its APN activity). These findings may have implications for tumor biology and treatment.

Keywords: AML; APN; antibody; inhibitor; Bcl2 family.

INTRODUCTION

Aminopeptidase-N (APN)/CD13 (EC 3.4.11.2) is a transmembrane protease present in many tissues and cell types (e.g. endothelial and epithelial cells, fibroblasts and leukocytes) (1). CD13 expression is dysregulated in inflammatory diseases and in solid and hematological tumors (1). Furthermore, CD13's enzymatic activity modulates the responses of bioactive peptides (e.g. vasoactive peptides, neuropeptides and chemokines)(1). The CD13 protein is also a receptor for coronaviruses (1). Several natural and synthetic APN inhibitors have been characterized and used to reveal that CD13 can influence major biological processes, including cell growth and invasion and angiogenesis in various cellular systems (1-3). CD13's involvement in these processes has mostly been confirmed by blockage with anti-CD13 monoclonal antibodies (mAbs) (2-9). However, the molecular mechanisms underlying these effects have yet to be described in detail. Indeed, it is not clear whether APN enzymatic activity is required for CD13's other functions. Some researchers have suggested that signal transduction accounts for some of CD13's functions (10-12). With regard to apoptosis, the presence of CD13 correlates with neutrophil resistance to TNF- α -induced apoptosis via reduced shedding of TNF-receptor I (13). Although studies with APN inhibitors have indicated a potential role for CD13 in apoptosis, this effect remains controversial because high doses of the inhibitors used might induce cytotoxicity in a non-specific manner (1, 12).

Acute myeloid leukemia (AML) is a deadly disease characterized by the clonal expansion and accumulation of hematopoietic stem cells arrested at various stages of development. The latter are used to define distinct AML subfamilies (14-16). CD13 is strongly expressed on stem cells and leukemic blasts in all AML subtypes (1, 16). Leukemia cells are unable to undergo (i) growth arrest, (ii) terminal differentiation, (iii) apoptosis in response to appropriate environmental stimuli and disseminate from the bone marrow into peripheral

tissues (14-16). There are no data on CD13's possible functions in AML cells or its contribution to the course of the disease.

In the present study, we investigated and compared the effects of anti-CD13 mAbs and inhibitors of APN/CD13 enzymatic activity on the AML cell line U937 *in vitro* and AML patients' cells *ex vivo*. In contrast to APN inhibitors, anti-CD13 mAbs induced growth arrest and apoptosis in AML cells. We identified some of the molecular apoptotic pathways triggered by CD13 ligation and that led to mitochondrial membrane depolarization, caspase activation and the alteration expression of Bcl-2 family proteins known to be involved in the control of mitochondrial-dependent apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Anti-CD13 (MY7, mIgG1), anti-CD13 (SJ1D1, mIgG1), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD13 (SJ1D1, mIgG1), fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD14 (RM052, mIgG2a), FITC-anti-CD33 (mIgG1, D3HL60.251) and goat F(ab')₂ fragment anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conjugated Ig (GAM-FITC) were obtained from Beckman-Coulter (Luminy, France). Anti-CD13 WM15 (mIgG1) was purchased from BD-Pharmingen (San Jose, CA, USA). The anti-CD13 mAbs were found to be endotoxin-low (< 0.1 EU) in the LAL assay developed by Genscript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA). FITC-mIgG1, FITC-mIgG2a, anti-phospho-Ser¹³⁶-Bad (Ser¹³⁶, rabbit IgG), anti-Bad (H-168, rabbit IgG), anti-PARP-1 (F-2, mIgG2a), anti-Bid (FL-195, rabbit IgG), anti-Bcl2 (100, mIgG1) and anti-Mcl-1 (S-19, rabbit IgG) were from Santa-Cruz (Tebu-Bio, SA, France). Z-IETD-fmk (a caspase-8 inhibitor), caspase-3/-8/-9 kit assays and mIgG1 were obtained from R&D Systems (Abingdon, UK). Anti-actin (C4, mIgG1) was from ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA). Anti-Bax (33-6400, mIgG1) was obtained from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Horseradish

peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare Europe (Saclay, France). Bestatin, Ala-p-nitroanilide, etoposide and phorbol myristoyl acetate (PMA) were obtained from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Z-VAD-fmk (a broad spectrum caspase inhibitor) was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ac-LEHD-CHO (a caspase-9 inhibitor) was from AG Scientific, Inc. (San Diego, CA, USA). The specific CD13/APN inhibitor 2',3-dinitroflavone-8-acetic acid (DNFAA) was synthesized as described in (17) and dissolved in DMSO.

Cells and treatments

The mycoplasma-free AML cell line U937 (with the French-American-British/FAB phenotype M5, monoblast) was cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco; LPS levels < 0.1 ng/ml), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 40 µg/ml gentamycin (Gibco) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Cells were used at passage 8 or less and harvested in log-phase growth for every experiment. Cells ($1-3 \times 10^5$ /ml) were treated with APN inhibitors (1-100 µM), IgG1 or anti-CD13 mAbs (1-50 µg/ml) for various periods of time. Etoposide (1 µM) was used as a positive control for apoptosis induction. In negative control experiments, cells were treated with the same volume of phosphate-buffer saline containing 0.1% sodium azide and 0.5% bovine serum albumin (vehicle). Caspase inhibitors were added at the beginning of the cultures and incubated for 60 min prior to the addition of MY7.

Blood samples from healthy donors were purchased from the Etablissement Français du Sang (Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France). Leukemic blood samples from 18 treatment-naïve AML patients (10 men and 8 women; age range: 22-80) were obtained from Saint-Antoine Hospital (Tumorotheque Leucémies Saint-Antoine, reference 579, Paris, France) after the provision of informed consent and in agreement with the Declaration of Helsinki and its revisions. Diagnosis was established according to standard clinical criteria and the FAB

committee's cytological criteria. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by Ficoll-Hypaque density gradient (1.077 g/mL) centrifugation. Leukemic cells were CD13⁺CD33⁺. Normal monocytes (CD13⁺ CD14⁺) were isolated by adherence, as described in (18). Cells (10⁶/ml) were cultured in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS.

Determination of cell growth, cell death and cell cycle

Cell growth was evaluated by counting the number of viable cells (with diameters ranging from 9 to 14 µm) and dead cells (diameters ranging from 4 to 9 µm) in a Coulter Multisizer (Beckman-Coulter). Cell cycle status was determined as described in (19) and measured with a flow cytometer (Beckman-Coulter).

Flow cytometry

Intact cells were direct or indirectly immunostained with anti-CD13 mAbs and GAM-FITC, as described in (20). Intracellular CD13 staining was performed in permeabilized cells by using the FACS permeabilizing kit and technique developed by BD Pharmingen. Apoptosis was measured using the annexin V-FITC/propidium iodide (PI) apoptosis detection kit (Beckman-Coulter). Stained cells (40,000) were analyzed by flow cytometry.

DNA fragmentation

Cells were washed twice with PBS and lysed in M-PER buffer (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) for 60 min on ice. Lysates containing fragmented DNA were cleared by centrifugation at 10 000 g for 15 min. Supernatant samples were treated with proteinase K (500 µg/ml) at 50°C for 2 h. Thereafter, RNase A (500 µg/ml) was added and the samples were incubated at 50°C for 90 min. Electrophoresis was performed in 1.8% agarose gels containing ethidium bromide and the bands were analyzed in an Appligen Oncor densitometer (Illkirch, France).

Assessment of mitochondrial membrane permeability

The loss of mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed using the mitochondrial detection kit (Biomol GmbH, Hamburg, Germany), as described previously (21). Following mAb treatment, cells were labeled with the lipophilic fluorochrome dye JC-1. The sample's fluorescence was recorded in a Wallac Victor 2 multitask plate reader (Perkin Elmer, Norwalk, MT, USA). The depolarization of MMP is characterized by a shift from red fluorescence (FL2) to green fluorescence (FL1), i.e. a reduction in the red/green fluorescence ratio.

Enzyme assays

APN activity at the surface of intact cells (2×10^6 /ml) was assayed as described in (17) by using Ala-p-nitroanilide (Ala-pNA) (2 mg/ml). Formation of pNA was monitored at 405 nm. Results were expressed as nmol of pNA formed/30 min/ 10^5 cells at 37°C. To quantify any release of soluble APN, preconditioned medium was obtained by culturing the cells (1×10^6 /ml) for 6 h and 18 h at 37°C in complete RPMI without phenol red. After rapid centrifugation, the isolated cells and the culture medium were incubated with Ala-pNA in the presence or absence of the APN inhibitor DNFAA (100 μ M). Specific APN activity was determined by subtracting the amount of Ala-pNA hydrolyzed in the absence of DNFAA (100 μ M) from the amount of Ala-pNA hydrolyzed in the presence of DNFAA.

Caspase activities were assayed with specific substrates for caspase-3 (DEVD-pNA), caspase-8 (IETD-pNA) and caspase-9 (LEHD-pNA) in cell lysates (100 μ g/assay) using the caspase cellular activity assay kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Formation of pNA was monitored at 405 nm. Comparison of the absorbance of pNA from a treated sample with control sample allows determination of the relative increase in caspase activity.

Western blot analysis

Cells were lysed in M-PER buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). Western blot analysis was then performed as described previously (22). Immunoblotting was performed with primary antibodies diluted according to the manufacturer's instructions and samples were then incubated with HRP-coupled secondary antibodies. Blots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare Europe, Saclay, France) and NIH Image 1.63 software was used to quantify the intensity of the bands.

Data analysis

Data are presented as means \pm SD from ≥ 3 independent experiments. A two-tailed, paired Student's *t*-test was used to compare test and control groups. The threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

RESULTS

MY7, WM15 and SJ1D1 anti-CD13 mAbs label CD13 expressed on AML U937 cells to a similar extent

Surface expression of CD13 on U937 cells was assessed by flow cytometry with specific mAbs against different epitopes of CD13; WM15 mAb is known to neutralize CD13's APN enzyme activity, whereas SJ1D1 and MY7 lack this inhibitory activity (23). As shown in **Fig. 1A**, all three anti-CD13 mAbs labeled surface CD13 to a similar extent. Analysis of surface APN activity showed that saturating concentrations of SJ1D1 and MY7 had no effect on APN activity, whereas WM15 reduced the activity by $44\% \pm 2$ ($n = 3$) (**Fig. 1B**). The inhibitors bestatin and DNFAA also reduced APN activity to a similar extent (**Fig. 1B**). Residual enzyme activity was likely due to other cell surface aminopeptidases (24).

Anti-CD13 mAbs induce growth arrest and apoptosis of AML U937 cells

We next examined the effects of anti-CD13 mAbs on the growth and viability of U937 cells. Cells were cultured for 72 h in the absence or presence of increasing concentrations (1-50 $\mu\text{g/ml}$) of MY7, SJ1D1 or WM15. Cell growth was markedly reduced in anti-CD13 mAb-treated samples, when compared with isotype-matched IgG1, vehicle or no treatment (**Fig. 2A**). The IC_{50} values were around 5 $\mu\text{g/ml}$. Kinetic studies revealed a time-dependent, inhibitory effect of anti-CD13 mAbs on U937 cell growth (**Fig. 2B**). Cell growth arrest was accompanied by reduction in DNA content to sub-G1 levels (**Fig. 2C** for MY7; data not shown for SJ1D1 and WM15) and internucleosomal DNA fragmentation (**Fig. 2D**) characteristic of apoptosis. Moreover, the average diameter of dead cells ($\leq 9 \mu\text{m}$) was smaller than that of living cells. Apoptosis was further confirmed by phosphatidylserine exposure at the cell surface, with consequential annexin V-FITC binding. Indeed, annexin-V binding was higher in anti-CD13 mAb-treated cells than in untreated cells or those treated with IgG1 or vehicle (**Fig. 3A**). The anti-CD13 mAbs' pro-apoptotic effects were time- (**Fig. 3B**) and dose-dependent (**Fig. 3C**).

U937 cell growth and survival are not affected by the inhibition of APN/CD13 enzymatic activity

WM15 mAb was just as efficient as MY7 and SJ1D1 in strongly blocking cell growth, suggesting that CD13's active site is not involved in the inhibitory action of anti-CD13 mAbs on U937 cells. To confirm this hypothesis, we assessed the ability of APN/CD13 inhibitors to induce growth arrest and apoptosis in U937 cells. Phorbol myristoyl acetate (2 nM) was used as a positive control for blocking U937 cell growth (**Fig. 4A**). At a concentration of 100 μM which inhibits APN activity on U937 cells (**Fig. 1B**), neither bestatin nor DNFAA affected the growth of U937 cells (**Fig. 4A**) or survival (**Fig. 4B**) after 96 h of treatment. These results

demonstrate that CD13's APN activity does not contribute to anti-CD13 mAb-mediated growth arrest and apoptosis in U937 cells.

MY7-induced internalization of surface CD13 by U937 cells

Since the internalization of cell surface receptors is thought to be a necessary step in signaling, we used flow cytometry to assess internalization of CD13 by the MY7 anti-CD13 mAb (as a decrease in CD13 surface expression). Cells were incubated with MY7 (20 µg/ml) for 6 and 18 h at 37°C. As seen in **Fig. 5A panel c**, surface CD13 levels fell over time on MY7-treated cells but did not change on untreated cells (**Fig. 5A panel a**) and IgG1-treated cells (**Fig. 5A panel b**). Accordingly, the U937 cells' surface APN activity was specifically decreased by stimulation with MY7 (**Fig. 5B**). No significant differences in intracellular CD13 staining were observed for untreated cells and IgG1- and MY7-treated cells (data not shown). In parallel, enzymatic assays on culture media from untreated cells and IgG1- and MY7-treated cells were performed (i.e. to check that surface CD13 downregulation did not result from shedding into the culture medium). Non-stimulated cells released low levels of soluble APN (<10% of the total APN activity in intact cells) (**Fig. 5C**). When U937 cells were activated with PMA (i.e. a positive control), surface CD13 expression and activity rose (**Fig. 5A & B**). This increase was accompanied by the release of soluble APN (with a significant, 5.7-fold enhancement at 18 h) (**Fig. 5C**). In contrast, the APN activity released from MY7-treated cells did not vary over time, when compared with untreated and IgG1-treated cells (**Fig. 5C**). These findings indicate that CD13 downregulation by MY7 likely results from cell internalization of CD13-MY7 complexes.

The fact that isotype control IgG1 had no effect on U937 cells (**Fig. 1A**) strongly suggested that the Fcγ-receptors I (Fcγ-RI/CD64) on myeloid cells were not involved in the induction of apoptosis by anti-CD13 mAbs. U937 cells expressed detectable levels of CD64 (**Fig. 5A**

panel e), which were neither affected by IgG1 (**Fig. 5A panel f**) nor MY7 (**Fig. 5A panel g**) treatments; this observation confirmed that MY7-mediated apoptosis does not involve signaling induced by CD64 internalization.

MY7-induced U937 cell apoptosis involves a caspase-dependent mechanism

Caspases -3, -8 and -9 are important mediators of apoptosis; caspases -8 and -9 are the initiator caspases and caspase-3 is the "executioner enzyme" (25, 26). In order to establish whether caspases -3, -8 and/or -9 are activated during anti-CD13 mAb-mediated apoptosis, we studied the ability of U937 cell lysates to cleave chromogenic substrates of these enzymes. Untreated U937 cells display similarly low baseline levels of all three caspase activities. Etoposide (1 μ M) was used as a positive control, since it triggers U937 cell death by activating these caspases (27, 28) (**Fig. 6A**). Kinetic studies indicated that cell treatment with MY7 (35 μ g/ml) resulted in a time-dependent increase in all three caspase activities, relative to untreated cells (**Fig. 6A**). Accordingly, Western blot analyses showed that exposure of U937 cells to MY7 induced the cleavage of the downstream caspase-3 substrate poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) (**Fig. 6A**). To determine whether the initiator caspase in the extrinsic pathway (i.e. caspase-8) or the intrinsic pathway (i.e. caspase-9) is involved in the apoptotic action of MY7, we examined the effects of a broad-spectrum caspase inhibitor (Z-VAD-fmk) and selective inhibitors of caspase-8 (Z-IETD-fmk) and caspase-9 (Ac-LEHD-CHO) on cell viability. MY7-induced cell death was blocked markedly by Z-VAD-fmk (85% of inhibition) and to a lesser extent by Ac-LEHD-CHO (41% of inhibition) and Z-IETD-fmk (33% of inhibition) (**Fig. 6B**). These results showed that MY7 induces caspase-dependent cell death through both the intrinsic and extrinsic pathways.

MY7 treatment induces mitochondrial membrane depolarization, Bax upregulation and Bcl-2 and Mcl-1 downregulation

To confirm the intrinsic pathway's involvement in MY7-induced apoptosis, we investigated the role of the mitochondria. In a fluorescence-based assay, the exposure of U937 cells to MY7 (35 µg/ml) induced a time-dependent decrease in the MMP (**Fig. 7A**). Mitochondrial membrane depolarization can result from the action of pro-apoptotic and/or anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (29). We therefore measured expression levels of Bad, Bax, and Bid pro-apoptotic proteins and Bcl-2 and Mcl-1 anti-apoptotic proteins before and after MY7 treatment. Untreated cells expressed high levels of Bax, Bcl-2, Bid and Mcl-1 (**Fig. 7B**). No changes were observed when cells were treated with control IgG1 (**Fig. 7B**). Consistently with previous studies in U937 cells, Bcl-2 and Mcl-1 levels were lower in etoposide-treated cells (27, 30, 31) than in untreated cells (**Fig. 7B**). MY7 downregulated Bcl-2 and Mcl-1 and upregulated Bax (**Fig. 7B**). In contrast, Bid levels were not markedly affected (**Fig. 7B**). Dephosphorylation of Bad results in pro-apoptotic effects in AML (32). U937 cells were negative for Ser¹¹²-phospho(p)-Bad (data not shown) and positive for Ser¹³⁶-p-Bad (**Fig. 7B**). MY7 did not alter the levels of Ser¹³⁶-p-Bad and total Bad (**Fig. 7B**).

Anti-CD13 mAb treatment induces apoptosis and PARP-1 cleavage in primary AML cells

Preliminary experiments had shown that the three anti-CD13 mAbs recognized similar levels of surface CD13 on primary human AML cells. To determine whether the anti-CD13 mAbs-induced apoptosis seen in U937 cells also occurs in primary AML blasts, we exposed PBMCs obtained from a cohort of 18 AML patients to IgG1 and to MY7 (35 µg/ml). Annexin-V binding was measured by flow cytometry after 72 h. Cultured AML cells exhibited variable baseline levels of spontaneous apoptosis (**Fig. 8A**), which were not increased by IgG1

treatment (data not shown). Exposure to MY7 increased apoptosis in 12 of the 18 samples (**Fig. 8A**) and this effect was observed in all the FAB subtypes tested. Additionally, MY7-responsive samples from five patients also responded to WM15 or SJ1D1 (data not shown). As shown in **Fig. 8B**, an increase in PARP-1 cleavage paralleled the induction of apoptosis in responders P5 and P12, whereas a lack of apoptosis in non-responders P15 and P16 was associated with the same PARP profile as in untreated and IgG1-treated samples. In contrast, MY7 did not affect the viability of normal PBMCs and isolated monocytes (**Fig. 8A**).

DISCUSSION

Surface CD13 is overexpressed on human AML cells, which show abnormally proliferation and survival. Here, we provide initial evidence that CD13 targeting by specific anti-CD13 mAbs promotes the apoptosis of AML cells and is correlated with the ability to signal through a caspase-dependent pathway.

We examined the effects of three anti-CD13 mAbs (MY7, SJ1D1 and WM15, which recognize different epitopes on the leukemic CD13 antigen) on the growth and survival of AML cells. MY7 and WM15 were obtained after immunization with blasts from AML patients (23, 33), whereas SJ1D1 was raised against CD13 from the myeloid cell line KG1 (23). The epitopes on CD13 bound by SJ1D1 and MY7 are very close together. The WM15 binding site overlaps that co-occupied by SJ1D1 (23). In contrast to MY7 and SJ1D1, WM15 inhibits CD13's APN activity (23, 34). In the present study, we showed that all anti-CD13 mAbs recognize similar levels of surface CD13 on the AML cell line U937 (FAB M5) and on M0-, M1-, M2-, M4- and M5-subtype primary AML cells. Following anti-CD13 mAb treatment, U937 cells undergo growth arrest and then apoptosis (as evidenced by sub-G1 cell-cycle accumulation, DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization). The results

in U937 cells were confirmed in primary AML cells (independently of the latter's FAB subtype), with MY7-mediated apoptosis observed in 12 of the 18 AML samples tested.

The APN-inhibiting WM15 mAb suppressed U937 cell growth to the same extent as the non-APN-inhibiting MY7 and SJ1D1 mAbs, suggesting that CD13's catalytic site is not involved in the anti-CD13 mAbs' inhibitory effect. Bestatin is the most frequently used CD13/APN inhibitor, although it does interact with other aminopeptidases (1). In this context, we had previously synthesized a series of novel flavone-8-acetic acid derivatives and selected 2',3-dinitroflavone-8-acetic acid (DNFAA) as an efficient APN inhibitor (17). Bestatin and DNFAA are both slow-binding, competitive inhibitors of APN (1). When used at a concentration of 100 μ M (which inhibits APN activity), bestatin and DNFAA did not alter cell growth and survival - implying that CD13's APN activity is not required for this process. It is noteworthy that the bestatin concentration used here is lower than that which inhibited the growth of tumor cell lines in other studies (1, 35).

The receptors for the Fc portion of IgG are immune-response modulating molecules. Two studies have shown that CD13 colocalizes with the Fc γ receptor I (Fc γ RI /CD64) on monocytes (36, 37). We found that (i) isotype control IgG1 did not influence cell growth and (ii) surface CD64 was not affected by MY7 treatment. These results indicate that Fc γ RI /CD64 does not potentiate MY7's effect on U937 cells.

Internalization of the CD13/anti-CD13 mAb complex suggests the existence of a signal pathway engaged by CD13. We therefore investigated the signaling pathways involved in the pro-apoptotic activity of anti-CD13 mAbs. Apoptosis can be initiated by the mitochondrial (intrinsic) pathway and/or the death-receptor (extrinsic) pathway (26, 38). In the intrinsic apoptotic pathway, mitochondria may function as an amplifier by activating the downstream caspases-9 and -3 (26, 38). In the present study, anti-CD13 mAb treatment dissipated the MMP, activated caspase-9 and caspase-3 and cleaved PARP-1 (a major substrate of caspase-

3) in U937 cells. The broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk and the caspase-9 inhibitor Ac-LEHD-CHO significantly attenuated MY7-mediated apoptosis, suggesting that anti-CD13 mAb treatment leads (at least) to the activation of a mitochondrial (intrinsic) caspase-dependent apoptosis pathway. Members of Bcl-2 family are important regulators of the intrinsic pathway (39). By modifying outer and inner mitochondrial membrane permeability, the Bcl-2 family (including pro-apoptotic Bad and Bax proteins and anti-apoptotic Mcl-1 and Bcl-2 proteins) regulate cytochrome C release from mitochondria, caspase activation and PARP-1 cleavage (26, 39). Overexpression of Bcl-2 protein rescues U937 cells from apoptosis (40). While Ser¹³⁶-phosphorylation of Bad protects AML cells from apoptosis (32, 41), unphosphorylated Bad can favor apoptosis by sequestering Bcl-2 within the cytoplasm and thus preventing the latter from binding to Bax; in turn, this promotes cytochrome C release (41, 42). Our data indicate that MY7 decreased Mcl-1 and Bcl-2 levels and increased Bax levels. However, the fact that MY7 did not affect Ser¹³⁶-p-Bad levels means that Bad is unlikely to be involved in anti-CD13-mediated apoptosis. It remains to be seen whether the inhibition of Bcl-2 and Mcl-1 by MY7 treatment is regulated at the transcriptional level or not.

In the extrinsic apoptosis pathway, triggering of death receptors (such as Fas antigen and TNF-R1) leads to strong caspase-8 activation. This bypasses mitochondria and leads directly to caspase-3 activation and then apoptosis (26, 38). However, small amounts of caspase-8 (activated by stress-induced signals within the cell) can activate the intrinsic pathway by inducing the production of truncated Bid (tBid) via the proteolytic cleavage of Bid (43). Following translocation from the cytosol to the mitochondrial membranes, tBid stimulates efficient oligomerization of Bax and activates the intrinsic pathway (43, 44). Our data indicate that MY7 increased caspase-8 activity in the absence of Bid cleavage and that the caspase-8 inhibitor Z-IETD-fmk at least in part attenuated cell death, suggesting that MY7 can also

activate the extrinsic apoptosis pathway. Caspase-8 activation may be related to the extrinsic pathway, with TNF-R and/or Fas antigen triggering. In the present study, very low amounts of TNF- α (≤ 90 pg/ml/ 10^6 cells at 24 h) were detected in conditioned media from U937 cells and MY7 does not alter TNF- α levels (B Bauvois, personal communication). Moreover, cell surface expression of Fas was not significantly modified by MY7 treatment. These data strongly suggest that anti-CD13 mAb treatment does not trigger death receptors. It remains to be seen whether anti-CD13 mAb treatment interferes with granzyme B and perforin (which can process procaspase-8) (45, 46).

In summary, we found that anti-CD13 mAbs have a modulating effect on AML cells. Hence, CD13 may be a pro-apoptotic target in this disease. The anti-CD13 mAbs' ability to promote cell death might open up new interventional strategies in the treatment of CD13⁺ tumors.

Accordingly, a recent study showed that anti-CD13 mAb WM15 was able to induce apoptosis in the HuH7 and PLC/PRF/5 human liver cancer cell lines *in vitro* (47). The very recent review by Wickström et al. (48) on CD13 evaluates the evidence for CD13 as a target in cancer therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Ligue contre le Cancer (Comité de Paris). The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

1. Bauvois, B., and Dauzonne, D. (2006) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* **26**, 88-130
2. Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A.,

- Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., and Ruoslahti, E. (2000) Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* **60**, 722-727
3. Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., and Shapiro, L. H. (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* **97**, 652-659
 4. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. (1993) Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer* **54**, 137-143
 5. Ino, K., Goto, S., Okamoto, T., Nomura, S., Nawa, A., Isobe, K., Mizutani, S., and Tomoda, Y. (1994) Expression of aminopeptidase N on human choriocarcinoma cells and cell growth suppression by the inhibition of aminopeptidase N activity. *Jpn J Cancer Res* **85**, 927-933
 6. Hashida, H., Takabayashi, A., Kanai, M., Adachi, M., Kondo, K., Kohno, N., Yamaoka, Y., and Miyake, M. (2002) Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* **122**, 376-386
 7. Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H., and Ortega, E. (2006) CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol* **79**, 719-730
 8. Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O'Connor, C., Grant, C. L., Vogel, L. K., Rodriguez-Pinto, D., Holmes, K. V., Ortega, E., and Shapiro, L. H. (2008) CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* **84**, 448-459
 9. Lai, A., Ghaffari, A., and Ghahary, A. (2010) Inhibitory effect of anti-aminopeptidase N/CD13 antibodies on fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* **343**, 191-199
 10. Lendeckel, U., Kahne, T., Riemann, D., Neubert, K., Arndt, M., and Reinhold, D. (2000) Review: the role of membrane peptidases in immune functions. *Adv Exp Med Biol* **477**, 1-24

11. Breljak, D., Gabrilovac, J., and Boranic, M. (2003) Aminopeptidase N/CD13 and haematopoietic cells. *Haema* **6**, 453-461
12. Mina-Osorio, P. (2008) The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med* **14**, 361-371
13. Cowburn, A. S., Sobolewski, A., Reed, B. J., Deighton, J., Murray, J., Cadwallader, K. A., Bradley, J. R., and Chilvers, E. R. (2006) Aminopeptidase N (CD13) regulates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* **281**, 12458-12467
14. Mason, K. D., Juneja, S. K., and Szer, J. (2006) The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Rev* **20**, 71-82
15. King, M. E., and Rowe, J. M. (2007) Recent developments in acute myelogenous leukemia therapy. *Oncologist* **12** Suppl 2, 14-21
16. Plesa, C., Chelghoum, Y., Plesa, A., Elhamri, M., Tigaud, I., Michallet, M., Dumontet, C., and Thomas, X. (2008) Prognostic value of immunophenotyping in elderly patients with acute myeloid leukemia: a single-institution experience. *Cancer* **112**, 572-580
17. Bauvois, B., Puiffe, M. L., Bongui, J. B., Paillat, S., Monneret, C., and Dauzonne, D. (2003) Synthesis and biological evaluation of novel flavone-8-acetic acid derivatives as reversible inhibitors of aminopeptidase N/CD13. *J Med Chem* **46**, 3900-3913
18. Bauvois, B., Van Weyenbergh, J., Rouillard, D., and Wietzerbin, J. (1996) TGF-beta 1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN-gamma: dependence on alpha 5 beta 1 and beta 2 integrins. *Exp Cell Res* **222**, 209-217
19. Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A. S., Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. (2007) Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* **109**, 2293-2302
20. Bauvois, B., Djavaheri-Mergny, M., Rouillard, D., Dumont, J., and Wietzerbin, J. (2000)

- Regulation of CD26/DPPIV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene* **19**, 265-272
21. Quiney, C., Billard, C., Faussat, A. M., Salanoubat, C., Ensaf, A., Nait-Si, Y., Fourneron, J. D., and Kolb, J. P. (2006) Pro-apoptotic properties of hyperforin in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **20**, 491-497
 22. Sanceau, J., Boyd, D. D., Seiki, M., and Bauvois, B. (2002) Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 35766-35775
 23. Favalaro, E. J., Bradstock, K. F., Kabral, A., Grimsley, P., Zowtyj, H., and Zola, H. (1988) Further characterization of human myeloid antigens (gp160,95; gp150; gp67): investigation of epitopic heterogeneity and non-haemopoietic distribution using panels of monoclonal antibodies belonging to CD-11b, CD-13 and CD-33. *Br J Haematol* **69**, 163-171
 24. Ashmun, R. A., and Look, A. T. (1990) Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood* **75**, 462-469
 25. Broker, L. E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**, 3155-3162
 26. Wang, Z. B., Liu, Y. Q., and Cui, Y. F. (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* **29**, 489-496
 27. Sun, X. M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B. B., Green, D. R., and Cohen, G. M. (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 5053-5060
 28. Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Janicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2000) Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* **19**, 4563-4573
 29. Maddika, S., Ande, S. R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A.,

- Eshraghi, M., Manda, K. D., Wiechec, E., and Los, M. (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* **10**, 13-29
30. Fujita, N., and Tsuruo, T. (1998) Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 484-488
 31. Sordet, O., Bettaieb, A., Bruey, J. M., Eymin, B., Droin, N., Ivarsson, M., Garrido, C., and Solary, E. (1999) Selective inhibition of apoptosis by TPA-induced differentiation of U937 leukemic cells. *Cell Death Differ* **6**, 351-361
 32. Zhao, S., Konopleva, M., Cabreira-Hansen, M., Xie, Z., Hu, W., Milella, M., Estrov, Z., Mills, G. B., and Andreeff, M. (2004) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia* **18**, 267-275
 33. Griffin, J. D., Ritz, J., Nadler, L. M., and Schlossman, S. F. (1981) Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J Clin Invest* **68**, 932-941
 34. Favaloro, E. J. (1991) CD-13 ('gp150'; aminopeptidase-N): co-expression on endothelial and haemopoietic cells with conservation of functional activity. *Immunol Cell Biol* **69** (Pt 4), 253-260
 35. Grujic, M., and Renko, M. (2002) Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions. *Cancer Lett* **182**, 113-119
 36. Mina-Osorio, P., and Ortega, E. (2005) Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcgammaRs in human monocytes. *J Leukoc Biol* **77**, 1008-1017
 37. Riemann, D., Tcherkes, A., Hansen, G. H., Wulfaenger, J., Blosz, T., and Danielsen, E. M. (2005) Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 1408-1412
 38. Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* **274**, 22532-22538

39. Martelli, A. M., Cocco, L., Capitani, S., Miscia, S., Papa, S., and Manzoli, F. A. (2007) Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and PTen: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem* **51** Suppl 1, 125-131
40. Park, C., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Choi, I. W., Kwon, T. K., Choi, B. T., Lee, S. J., Lee, W. H., and Choi, Y. H. (2008) Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells through activation of JNK and ERK. *Toxicol Appl Pharmacol* **227**, 219-228
41. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628
42. Bremer, E., van Dam, G., Kroesen, B. J., de Leij, L., and Helfrich, W. (2006) Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends Mol Med* **12**, 382-393
43. Song, G., Chen, G. G., Hu, T., and Lai, P. B. (2010) Bid Stands at the Crossroad of Stress-response Pathways. *Curr Cancer Drug Targets* **10**, 584-592
44. Afonina, I. S., Cullen, S. P., and Martin, S. J. (2010) Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev* **235**, 105-116
45. Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G. K. (2008) Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**, 10-27
46. Bulat, N., and Widmann, C. (2009) Caspase substrates and neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* **80**, 251-267
47. Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Ohkuma, M., Kim, H. M., Akita, H., Takiuchi, D., Hatano, H., Nagano, H., Barnard, G. F., Doki, Y., and Mori, M. (2010) CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* **120**, 3326-3339
48. Wickstrom, M., Larsson, R., Nygren, P., and Gullbo, J. (2011) Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci* in press

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of CD13 on U937 cells and related APN activity.

A) U937 cells were incubated with anti-CD13 mAbs (MY7, SJ1D1 or WM15) or IgG1, stained with GAM-FITC and then examined by flow cytometry (black line). Cells treated with isotype control IgG1 served as the negative control (dotted line). *B)* Cells were assayed for APN activity using the chromogenic substrate Ala-pNA, in the absence or presence of anti-CD13 mAbs (20 µg/ml) or the APN inhibitors bestatin and DNFAA (10 and 100 µM in both cases), as described in the Materials and Methods section. The results are expressed in nmol of pNA formed/30 min/ 10^5 cells at 37°C. Values are means \pm SD (n = 3).

Figure 2. Effects of anti-CD13 mAbs on U937 cell growth, cell cycle arrest and DNA integrity.

U937 cells (10^5 /ml) were treated with anti-CD13 mAbs at the indicated concentrations for the indicated times. *A)* Concentration-dependent growth after 72 h of treatment. Controls included appropriate dilutions of IgG1 and buffer vehicle. Values are means \pm SD. All experiments were performed in duplicate and were repeated at least 5 times. *B)* Time-dependent growth with anti-CD13 mAbs (35 µg/ml). Values are means \pm SD. All experiments were performed in duplicate and were repeated at least 4 times. *C)* DNA contents of U937 cells treated for 72 h with MY7 or IgG1 (35 µg/ml) were analyzed by flow cytometry. *D)* DNA fragmentation U937 cells treated for 72 h with MY7 or IgG1 (35 µg/ml) or with etoposide (1 µM, positive control).

Figure 3. Anti-CD13 mAbs induce apoptosis in U937 cells.

A) Apoptosis of U937 cells cultured for 72 h with IgG1 or anti-CD13 mAbs (35 µg/ml) was evaluated by flow cytometry of FITC-conjugated annexin-V binding, while simultaneously assessing necrosis by PI staining. Results are expressed as log PI fluorescence intensity (y-axis) vs. log annexin-V fluorescence intensity (x-axis). Annexin-V-positive cells are highlighted in the box and their percentage is shown in the Figure. One representative experiment is shown. *B)* Cells were incubated for 24, 48, 72 and 96 h in the presence or absence of IgG1 or anti-CD13 mAbs (35 µg/ml) and apoptosis was assessed as described in *A)*. *C)* Cells were incubated for 72 h with increasing concentrations of IgG1 or anti-CD13 mAbs (5-50 µg/ml) and apoptosis was assessed as described in *A)*. Values are means ± SD. All experiments were performed in duplicate and were repeated at least 4 times.

Figure 4. Effects of inhibitors of APN activity on U937 cell growth and survival.

A) U937 cells (10^5 /ml) were treated with bestatin or DNFAA (100 µM) or PMA (2 nM, used as positive control of growth arrest and death induction) for the indicated times. Values are means ± SD. All experiments were performed in duplicate and were repeated 3 times.

B) Cells (10^5 /ml) cultured for 96 h in the presence or absence of bestatin, DNFAA or PMA, were stained with annexin-V-FITC/PI and analyzed by flow cytometry. Experiments were repeated 3 times. One representative experiment is shown. The percentage of annexin-V positive cells is shown in the box.

Figure 5. Effects of the anti-CD13 mAb MY7 on surface CD13 expression, surface APN activity and soluble APN activity in U937 cells.

U937 cells (10^5 /ml) were cultured for 6 and 18 h in the absence or presence of IgG1 or MY7 (20 µg/ml) or PMA (200 nM, used as a positive control). Thereafter, the conditioned medium was collected as described in the Materials and Methods section and intact cells were assayed for CD13 expression and APN activity. *A)* Cells were stained with anti-CD13-PE (clone

SJ1D1) or anti-CD64-FITC and then examined by flow cytometry (black line). Cells stained with IgG1-PE and IgG1-FITC (isotype controls) served as negative controls (dotted line). *B&C*) APN activity was detected on 10^5 intact cells (*B*) and in conditioned medium (50 μ l) (*C*), as described in the Materials and Methods section. Specific APN activity (nmol of pNA formed /30 min at 37°C) was determined by subtracting the amount of pNA formed in the absence of DNFAA (100 μ M) from the amount of pNA formed in the presence of DNFAA. Values are means \pm SD (n = 3).

Figure 6. Anti-CD13 mAb MY7-induced apoptosis is caspase-dependent.

A) U937 cells were treated for 24 h with IgG1 or MY7 (35 μ g/ml) or etoposide (1 μ M) or left untreated. Caspase-3, -8 and -9 activities were determined using the substrates DEVD-pNA IETD-pNA and LEHD-pNA, respectively. The release of pNA was measured at 405 nm. The data are expressed as a fold-increase relative to the corresponding untreated samples (baseline values for caspase-3, -8 and -9 activity were respectively 1.3 ± 0.2 , 2.3 ± 0.2 and 0.9 ± 0.1 nmol pNA/60 min/100 μ g protein at 37°C). Data are means \pm SD from 3 assays. * $P < 0.05$ vs the corresponding untreated samples. IgG1 did not alter the caspase activity profile. As shown in the left-hand box, U937 cell lysates were examined for PARP-1 expression by immunoblotting. *B*) U937 cells were incubated with IgG1 or MY7 (35 μ g/ml) for 48 h after 1 h of pretreatment with Z-VAD-fmk (a broad-spectrum caspase inhibitor), Ac-LEHD-CHO (a caspase-9 inhibitor) or Z-IETD-fmk (a caspase-8 inhibitor) (50 μ M). Cell death was determined as described in the Materials and Methods section. The percentage of specific MY7-mediated cell death was obtained by subtracting the percentage of baseline death in untreated cells or cells pretreated with caspase inhibitor from the percentage of death in the corresponding MY7-treated cells. IgG1 did not alter the baseline levels of apoptosis. Values

are means \pm SD. Separate experiments were performed in duplicate and were repeated 3 times. * $P < 0.05$ vs the corresponding untreated cells.

Figure 7. Anti-CD13 mAb MY7 triggers dissipation of the mitochondrial membrane potential (MMP) and changes in Bax, Bcl-2 and Mcl-1 expression.

A) U937 cells were cultured for 24 and 48 h in the absence or presence of IgG1 or MY7 (35 μ g/ml). Thereafter, cells were incubated for 15 min at 37°C with the fluorescent probe JC-1, washed and then aliquoted in triplicate into microtiter plate wells. Green and red fluorescence were measured as detailed in the Materials and Methods section. Dissipation of the MMP is characterized by a significant shift in the red-to-green fluorescence ratio. Values are means \pm SD (n =3). * $P < 0.05$ vs corresponding untreated cells. *B)* U937 cells were treated with IgG1 or MY7 (35 μ g/ml) or etoposide (1 μ M) for 48 h. Thereafter, lysates were Western blotted with antibodies against Bax, Bcl-2, Mcl-1 (Long and Short forms), Ser¹³⁶-p-Bad, Bad, Bid and actin (a protein loading control). Two representative experiments (n= 3 in all) are shown.

Figure 8. Anti-CD13 mAb MY7 induces apoptosis and PARP cleavage in primary AML cells.

AML cells are characterized by the French American British (FAB) phenotypes M5/monoblastic, M4/myelomonocytic, M2/myeloblastic with maturation, M1/myeloblastic and M0/undifferentiated. *A)* AML cells were cultured in the presence or absence of MY7 (35 μ g/ml) for 72 h, stained with annexin-V-FITC/PI and analyzed by flow cytometry. *B)* Cell lysates were examined for PARP or actin expression in an immunoblot assay. The arrows indicate the cleaved form (cf) of PARP. Native PARP was not detected in sample 5. Responding cells have MY7-apoptosis and PARP cleavage. Non-responding cells lack MY7 (WM15)-apoptosis and PARP cleavage.

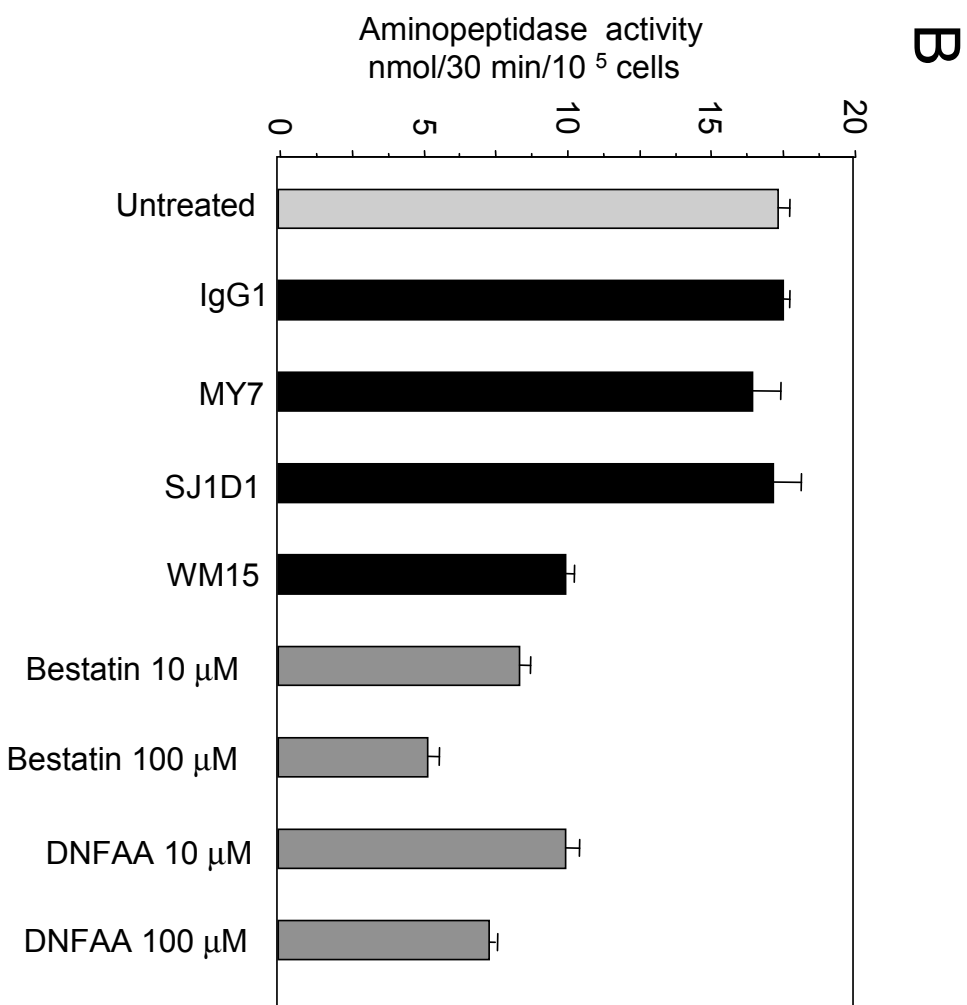
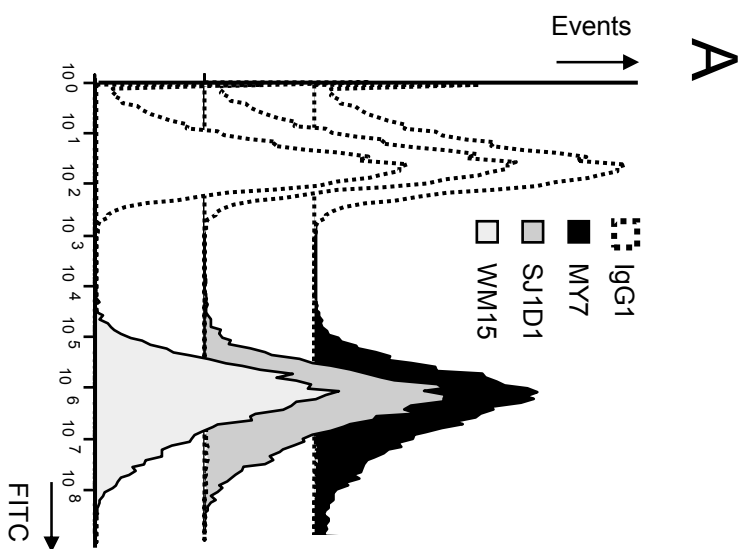


Figure 1

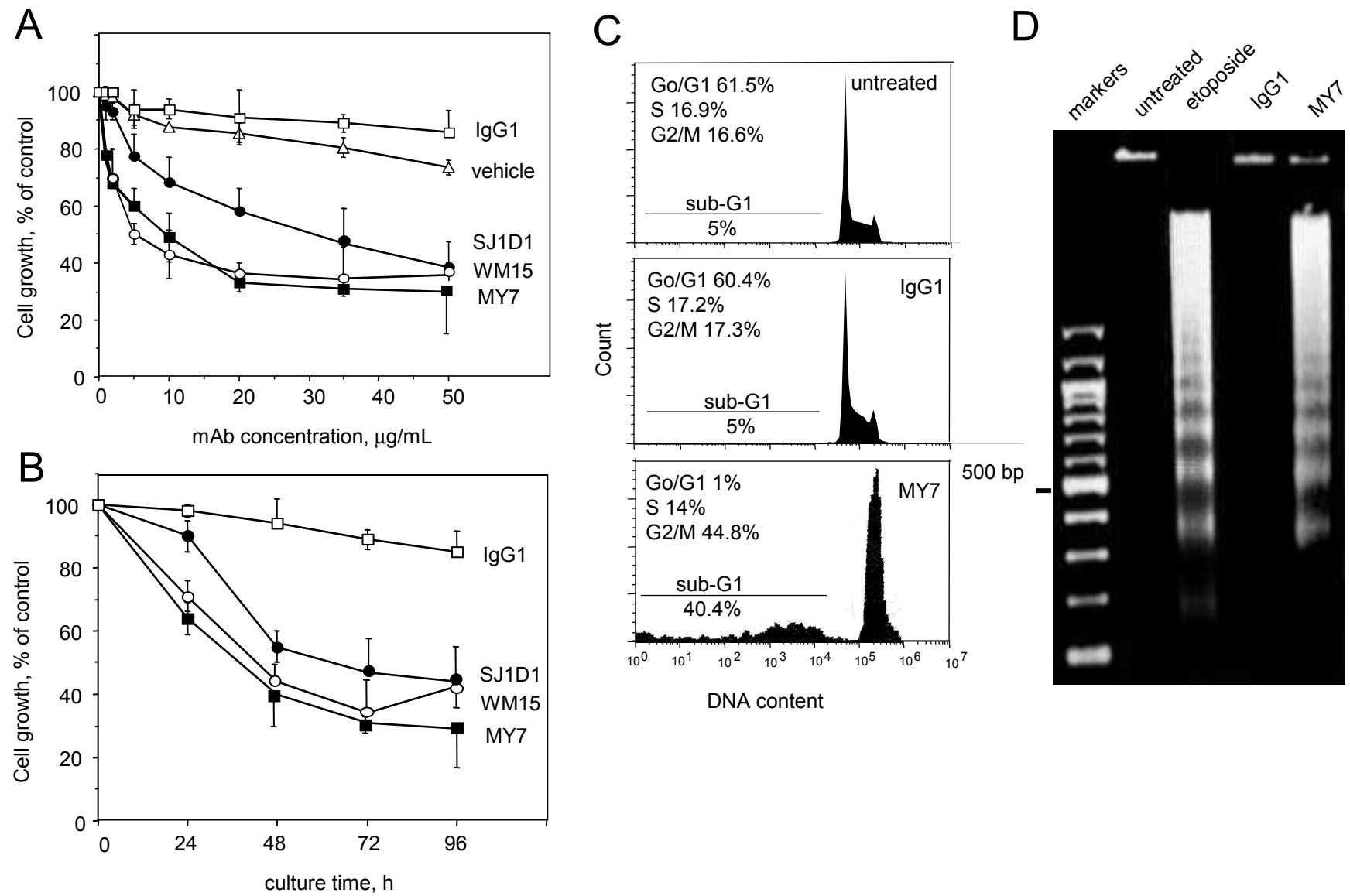


Figure 2

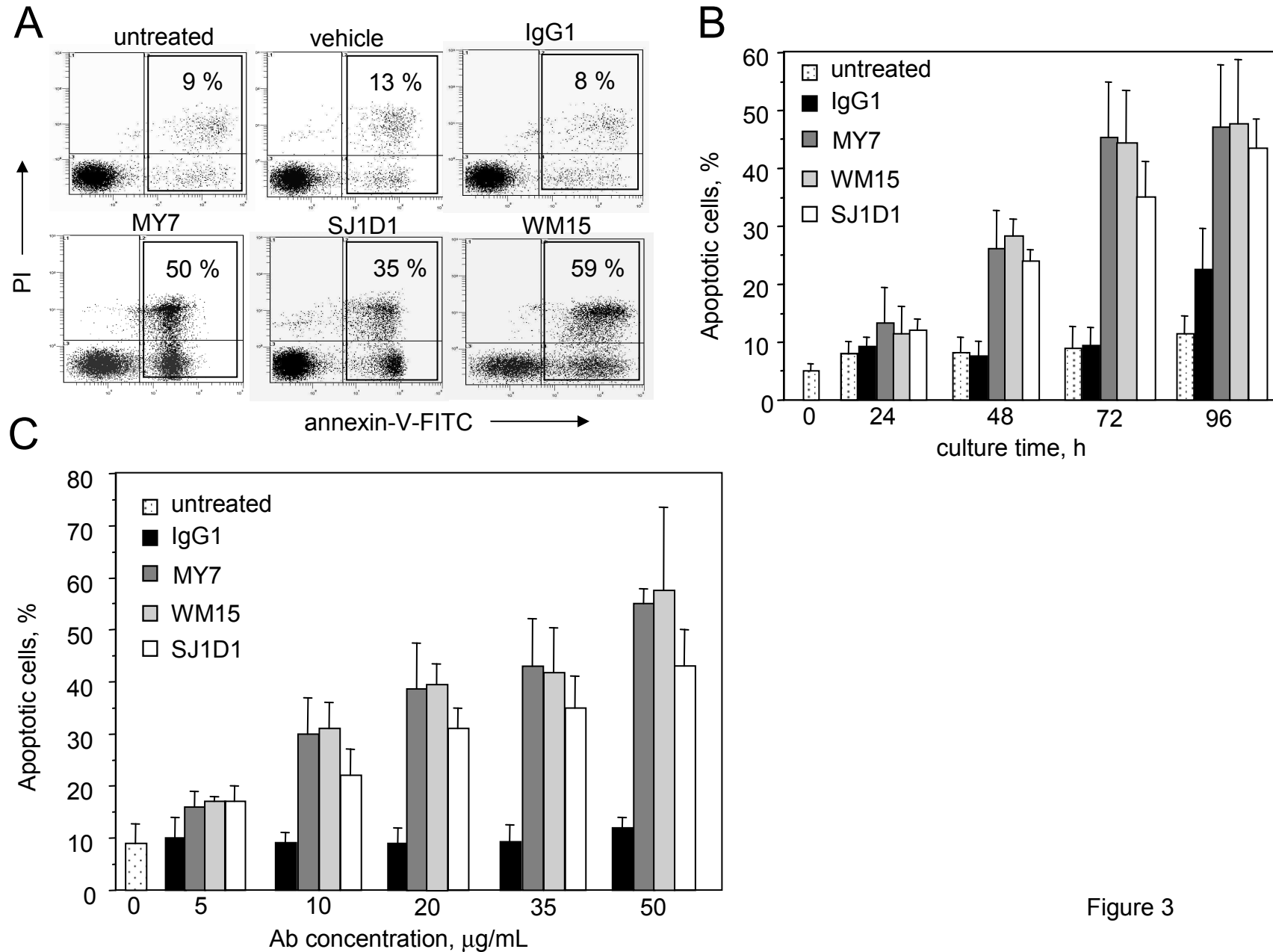


Figure 3

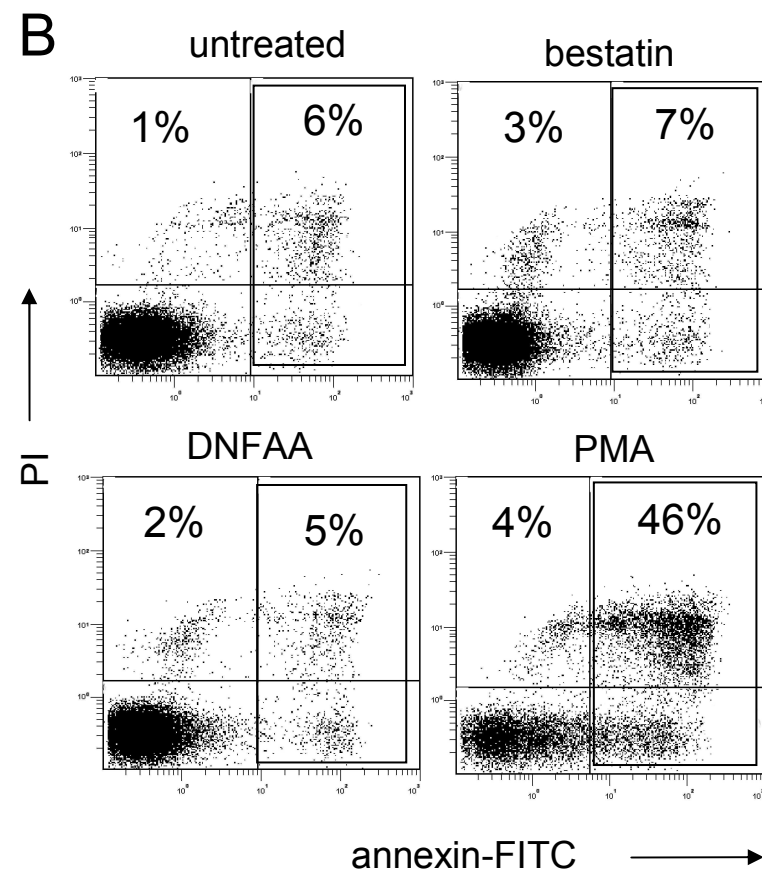
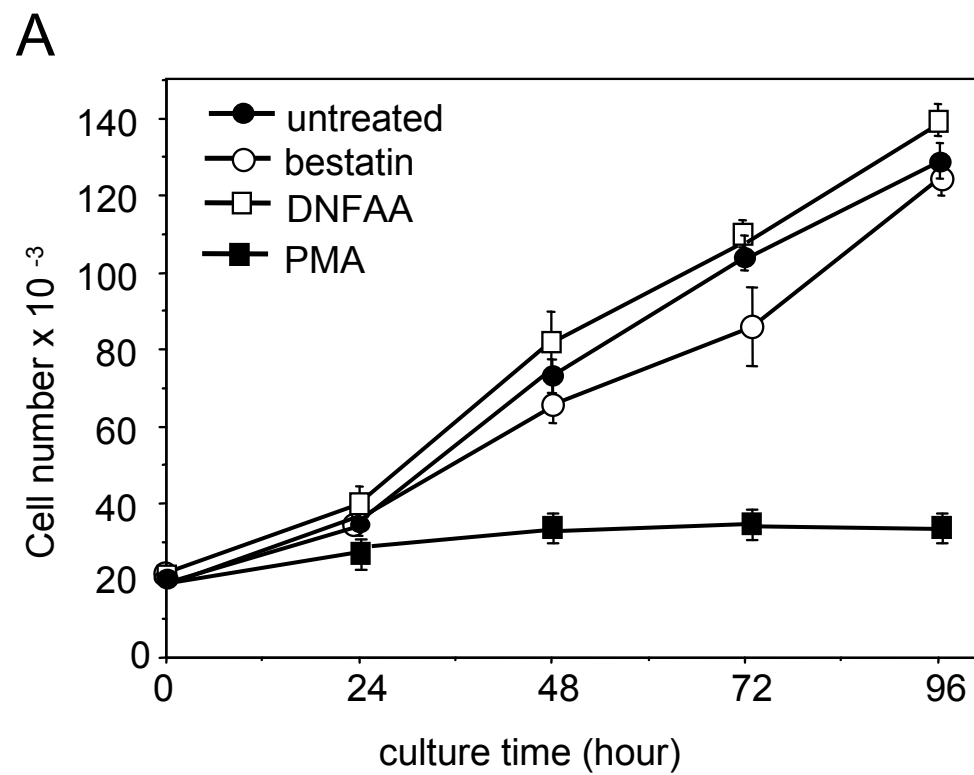


Figure 4

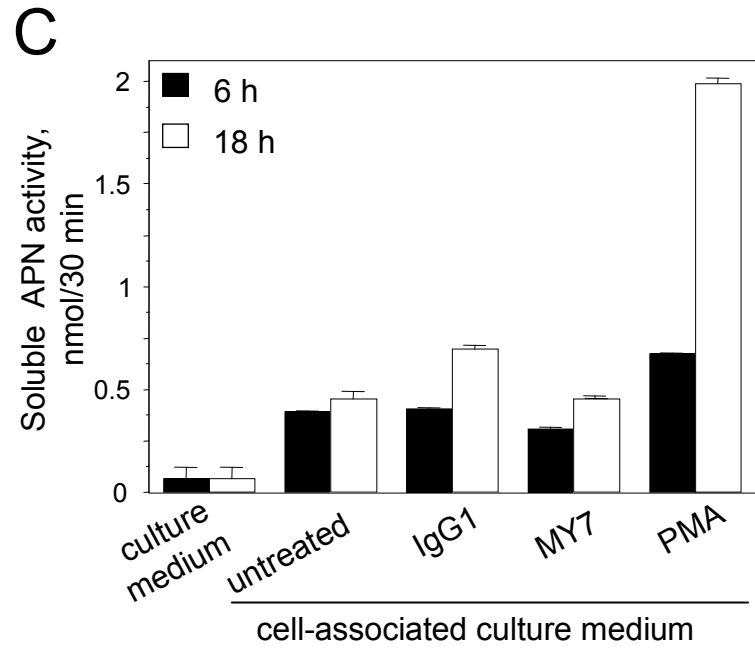
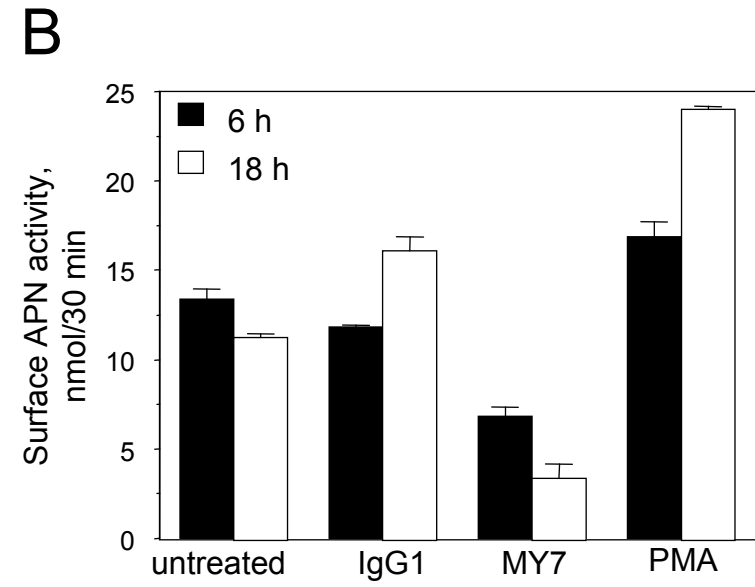
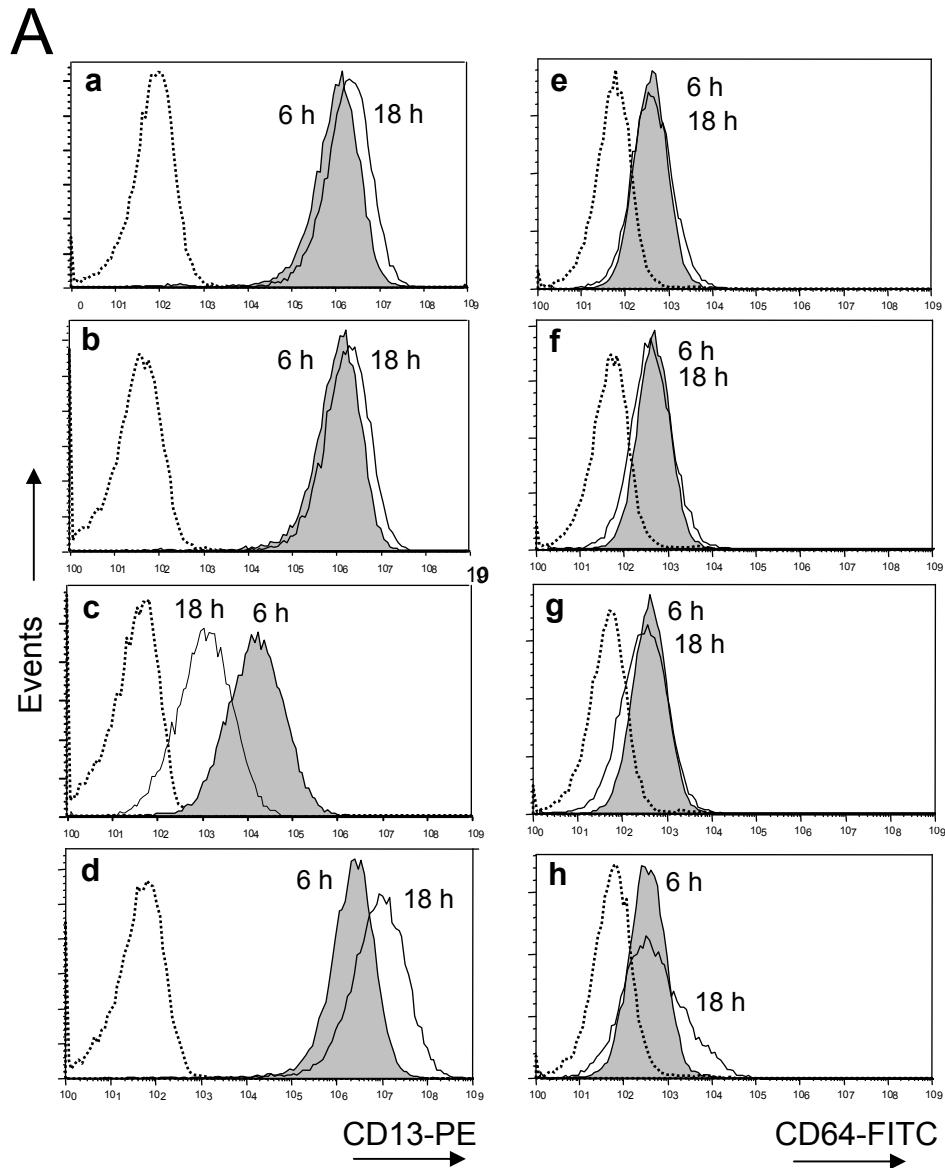


Figure 5

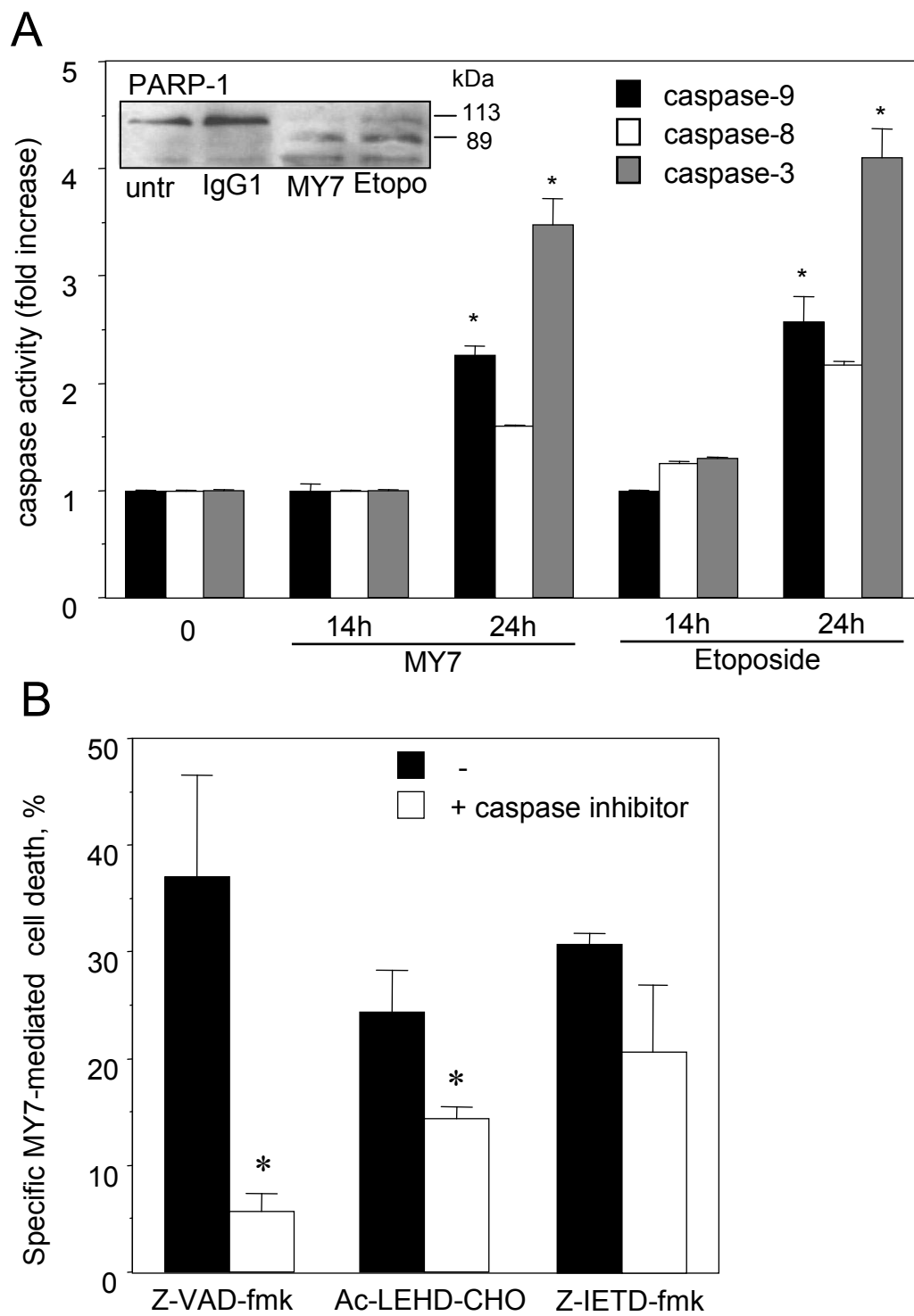


Figure 6

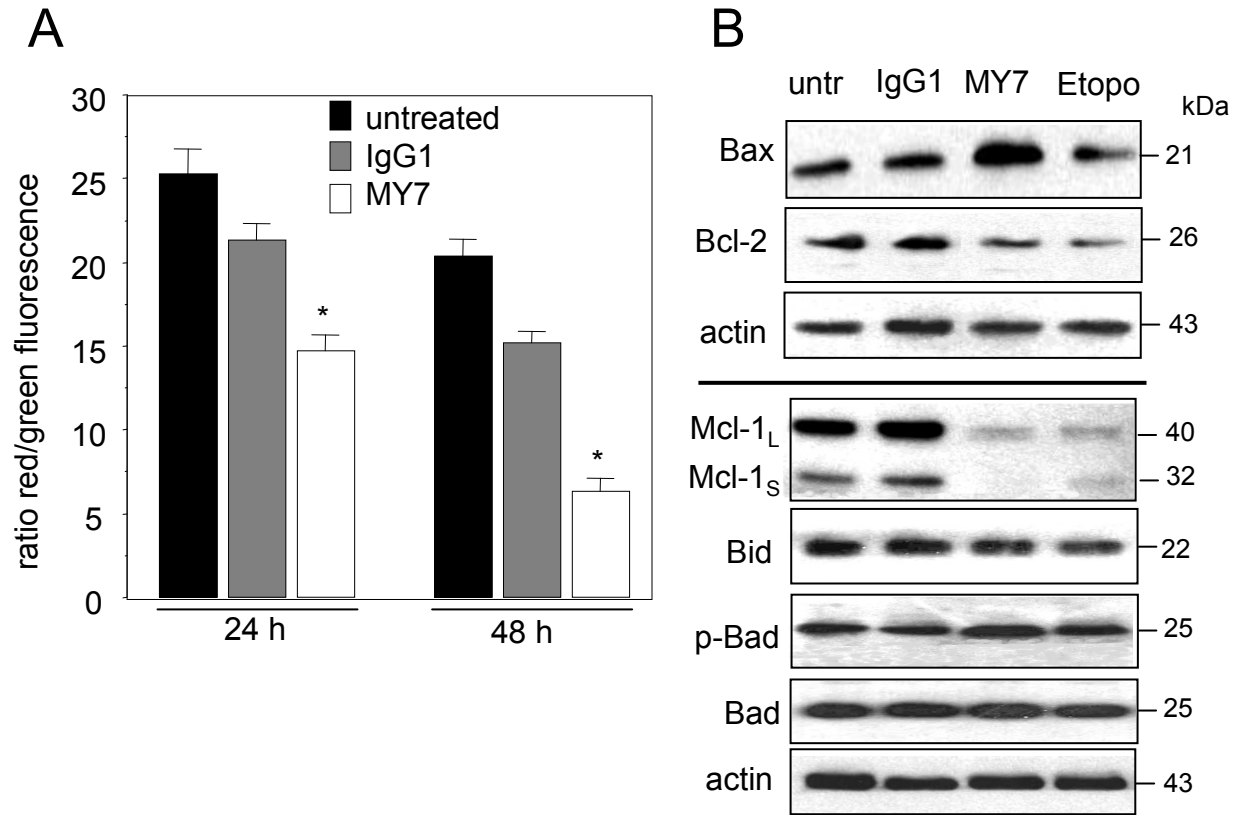


Figure 7

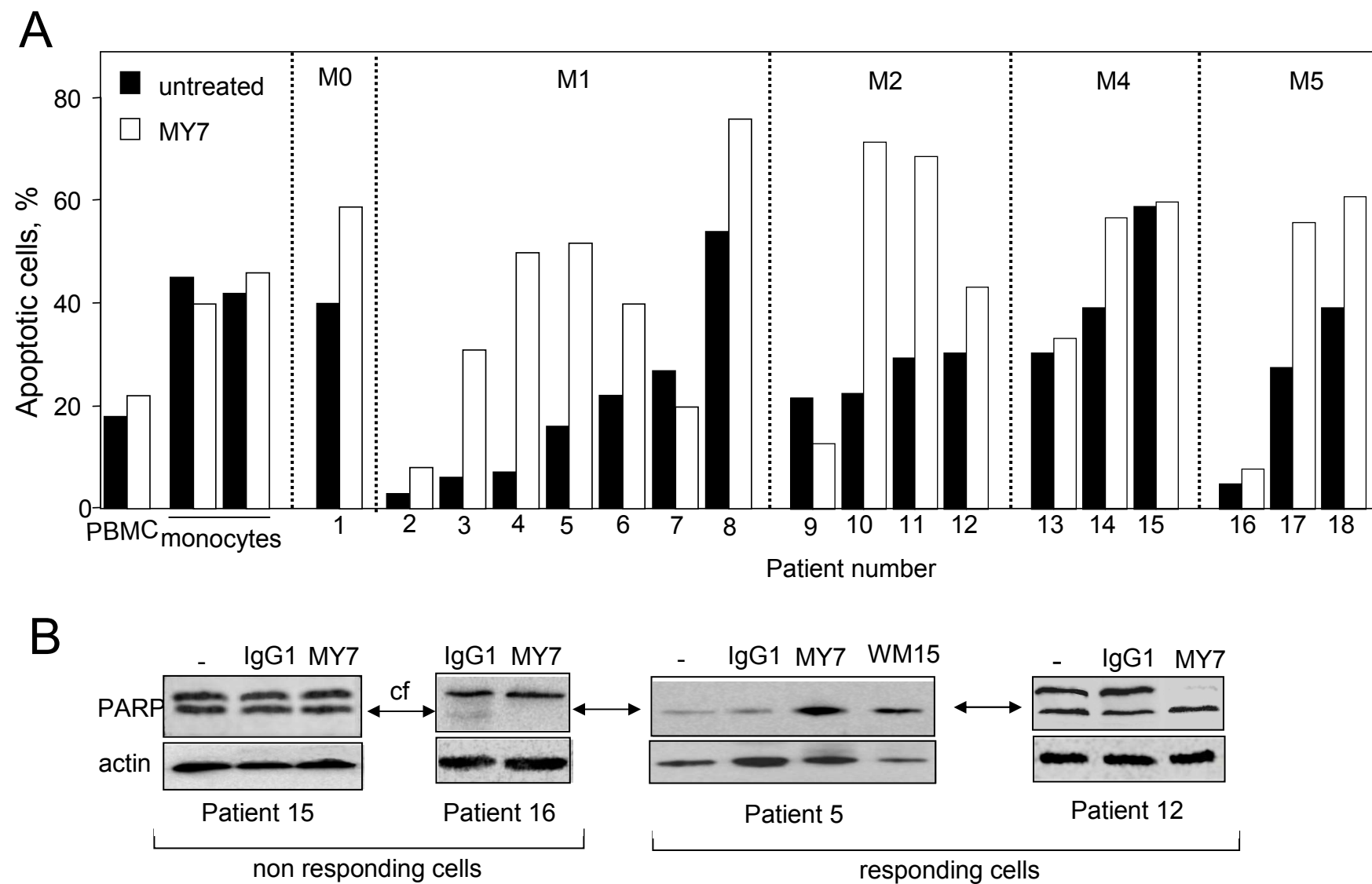


Figure 8

II. RESULTATS

Les effets des anti-CD13 et de DNFAA ont tout d'abord été étudiés sur une lignée leucémique myéloïde représentative des LAM, U937 (FAB M5). Un des trois anticorps monoclonaux testés, WM15, est capable d'inhiber l'activité enzymatique de CD13 au contraire des deux autres anticorps MY7 et SJ1D1 non neutralisants. Cette étude a permis d'établir que la ligation de CD13 par ses anticorps induit un arrêt de prolifération et une induction d'apoptose dans les cellules U937. En effet, ces anticorps, après internalisation, entraînent l'accumulation d'une population en sous-G1 du cycle, l'externalisation de la phosphatidyl-sérine et la fragmentation de l'ADN.

Nous avons aussi pu mettre en évidence l'activité pro-apoptotique des anti-CD13 sur les cellules primaires de patients atteints de LAM. Sur 21 malades (au diagnostic) nous avons pu observer que l'anti-CD13 MY7 exerce une activité pro-apoptotique *ex vivo* sur 18 échantillons quel que soit le FAB considéré (M1, M2, M4, M5). Les échantillons sanguins provenant d'individus sains ainsi que les monocytes isolés ne répondent pas au traitement par anti-CD13.

Bien que l'inhibiteur commercial bestatine soit largement utilisé pour cibler CD13, il est connu pour inhiber d'autres protéases comme la leucyl-aminopeptidase (EC 3.4.11.1) et l'aminopeptidase-W (EC 3.4.11.16) (Bauvois & Dauzone 2006). Les études démontrant un rôle antiprolifératif de la bestatine dans des lignées cellulaires variées, utilisent des concentrations élevées (100-200 μ M représentant plus 100 fois l' IC_{50}). Ainsi, Sekine et al (K Sekine et al. 1999) ont indiqué que la bestatine à la dose de 290 μ M est capable d'induire l'apoptose des cellules U937 *in vitro*. Nos expériences avec l'inhibiteur spécifique de CD13, DNFAA (IC_{50} 25 μ M), démontrent que des doses allant jusqu'à 100 μ M n'affectent pas la prolifération et la survie des cellules U937. Ce résultat, en plus de l'observation de l'induction de l'apoptose lors de l'utilisation des anticorps MY7 et SJ1D1 non neutralisants pour l'activité APN, suggère fortement que l'activité enzymatique de CD13 n'est pas requise pour la transmission de signaux intracellulaires conduisant à l'arrêt de prolifération et à l'induction d'apoptose.

L'internalisation du complexe CD13-antiCD13 dans les cellules U937 suggère l'existence d'un signal intracellulaire. Deux études précédentes avaient montré que CD13 colocalise avec CD64/FC- γ RI à la surface des cellules (Mina-Osorio & E. Ortega 2005) (Dagmar Riemann et al. 2005). Nous avons observé d'une part que l'isotype IgG1 (des anti-CD13) n'influence pas la prolifération et la survie des cellules U937, et d'autre part que l'inhibiteur piceatannol (qui inhibe la kinase Syk activée par les récepteurs Fc) ne bloque pas l'apoptose induite par MY7. Ceci implique que les effets pro-apoptotiques des anti-CD13 sont indépendants d'une cytotoxicité médiée par le CD64/FC- γ RI.

Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons montré l'implication des voies de signalisation de PI3K et Akt1 dans l'arrêt de prolifération et l'induction d'apoptose par MY7. Nous avons observé que MY7 induit une dissipation du potentiel mitochondrial, entraîne une activation de la caspase 9 (impliquée dans la voie intrinsèque d'apoptose), de la caspase 8 (impliquée dans la voie extrinsèque) et la caspase 3 (activable par les caspases 8 et 9). En

accord avec ces observations, l'apoptose induite par MY7 est inhibée par le Z-VAD-fmk (inhibiteur général des caspases) mais aussi par Ac-LEHD-CHO (inhibiteur de caspase 9) et Z-IETD-fmk (inhibiteur de caspase 8). Parmi les membres de la famille Bcl-2 analysés, trois protéines dont deux anti-apoptotiques (Mcl-1 et Bcl-2) et une pro-apoptotique (Bax) sont affectées par le traitement avec MY7. Les niveaux d'expression de Mcl-1 et Bcl-2 sont inhibés tandis que celui de Bax est fortement augmenté.

Dans notre étude, nous avons également montré que MY7 n'altère pas le niveau d'expression de Fas à la surface des cellules, n'augmente pas la production de TNF- α autocrine et n'induit pas de clivage de la protéine Bid (pouvant rendre compte d'une activation de la voie d'apoptose intrinsèque après une induction de la voie extrinsèque). Ces résultats permettent de suggérer que MY7 peut activer caspase 8 indépendamment des récepteurs de mort.

III. CONCLUSIONS

Le traitement par des anti-CD13 active les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose dans les cellules U937. Nous avons pu mettre en évidence la régulation négative de Mcl-1 et Bcl-2, accompagnée par la stimulation de Bax. MY7 active aussi la caspase 8 mais sans faire intervenir les récepteurs de mort. Il est possible que le traitement par MY7 stimule des protéases connues pour activer la pro-caspase 8 (granzyme B (Adrain et al. 2005), les cathepsines b (W.-C. Huang et al. 2009) et d (Conus et al. 2008)). Au contraire, l'inhibiteur enzymatique DNFAA n'affecte ni la prolifération ni la survie des cellules U937 indiquant que le domaine catalytique de CD13 n'est pas nécessaire pour la transmission du signal pro-apoptotique.

De plus, nous avons montré que les lignées représentatives des LAM, HL-60 (FAB M2), NB4 (M3), OCI-AML3 (M4) et THP-1 (M5) répondaient aussi au traitement pro-apoptotique des anti-CD13.

Les résultats obtenus sur une petite cohorte d'échantillons leucémiques (21) indiquent que le traitement par les anti-CD13 est aussi capable d'induire l'apoptose dans 18 cas représentant les FAB M1, M2, M4 et M5 (85%). Par contre, les cellules sanguines provenant de volontaires sains ne répondent pas aux anti-CD13. Finalement, les cibles moléculaires induites par les anti-CD13 dans les cellules primaires de LAM restent à déterminer.

Dans des expériences complémentaires, nous avons étudié les effets des anti-CD13 dans d'autres modèles cellulaires, à savoir la lignée leucémique B MEC-1 (CD13-) et des lignées de cellules adhérentes CD13+ (lignées épithéliales HepG2, HEK293 ; lignée endothéliale HMEC-1). Comme on pouvait s'y attendre, MY7 et SJ1D1 n'affectent ni la prolifération ni la survie des cellules MEC-1. De façon intéressante, les anti-CD13 n'affectent pas non plus les lignées CD13+. Bien que des expériences sur d'autres types de cellules adhérentes soient nécessaires, il semblerait que les cellules adhérentes CD13+ soient résistantes au traitement par anti-CD13. Ces données sont en faveur de l'intérêt du ciblage spécifique de CD13 des cellules leucémiques par l'approche des anti-CD13.

La résistance des cellules de LAM à la chimiothérapie s'explique en partie par l'expression augmentée des pompes ABC (qui effluent les anthracyclines) après chimiothérapie (O Legrand et al. 1999). En conclusion, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD13, en

induisant l'apoptose des cellules de LAM, pourrait permettre d'envisager un nouveau mode d'action thérapeutique dans le but d'augmenter l'efficacité des traitements à base de cytarabine et d'anthracyclines.

Article 2 :
***Un nouvel inhibiteur du protéasome cible
la kinase p70S6 et induit l'apoptose dans
les leucémies aiguës myéloblastiques***

**UN NOUVEL INHIBITEUR DU PROTEASOME CIBLE LA KINASE
P70S6 ET INDUIT L'APOPTOSE DANS LES LEUCEMIES AIGUËS
MYELOBLASTIQUES**

ARTICLE SOUMIS POUR PUBLICATION

PARTIE 3 – DISCUSSION

Le pronostic des LAM reste sombre à cause de la résistance aux traitements et des rechutes après rémission. Il y a eu des avancées dans le traitement des patients jeunes avec l'utilisation des thérapies intensives et des greffes de cellules souches hématopoïétiques mais le taux de survie à 5 ans est seulement de 40%. Chez les patients plus âgés, les taux de rémission sont encore plus faibles à cause des problèmes de tolérance des traitements intensifs et les taux de survie à long terme sont de 15% (Foran 2012). En conséquence, des thérapies moins agressives et mieux tolérées doivent être développées.

Les progrès réalisés concernant l'identification d'anomalies moléculaires présentes dans les leucémies ont mené au développement de thérapies spécifiquement dirigées contre celles-ci. Plusieurs approches sont en cours d'étude préclinique et clinique : des inhibiteurs des voies de signalisation dérégulées dans les LAM (PI3K/Akt/mTOR), des anticorps monoclonaux couplés à une drogue (Mylotarg®), des inhibiteurs du protéasome (bortezomib) et des modulateurs épigénétiques (déacétabine ...).

Dans ce contexte, les recherches du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse sont centrées sur la recherche de nouvelles cibles pro-apoptotiques capables de contrer la résistance et la survie des cellules tumorales. Des travaux récents, dont ceux du laboratoire, ont relancé l'intérêt pour des composés d'origine naturelle capables d'induire l'apoptose dans différents modèles de tumeurs hématologiques.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée dans un premier temps à l'étude du ciblage de l'antigène CD13 surexprimée dans les LAM.

Les équipes de Brigitte Bauvois et de Daniel Dauzonne (institut Curie CNRS UMR 176) avaient initialement identifié une molécule non cytotoxique qui inhibe spécifiquement de l'activité enzymatique aminopeptidase N portée par CD13 (Bauvois et al. 2003). Cet inhibiteur est un dérivé de l'acide flavone-8-acétique : acide 2',3-Dinitroflavone-8-acétique (DNFAA). Nous avons entrepris une étude comparative de cet inhibiteur et d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de CD13 (MY7, SJ1D1, WM15) dans le modèle des LAM.

Notre étude a montré clairement que DNFAA n'affecte ni la prolifération ni la survie des cellules de LAM (lignées et cellules primaires). Cependant, le traitement de ces cellules par les trois anti-CD13 induit l'apoptose en activant les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Dans la voie intrinsèque les anti-CD13 régulent négativement l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 et positivement l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax.

Le ciblage d'antigène de surface est une piste thérapeutique prometteuse dans les LAM. En effet, plusieurs anticorps dirigés contre les antigènes CD44, CD47 et CD33 sont en cours de développement. L'anticorps monoclonal ayant eu le développement clinique le plus poussé est un anti-CD33 couplé à une toxine, la calicheamicine (Mylotarg®). Le Mylotarg® ayant montré une activité significative chez des patients atteints de LAM, il a été rapidement mis sur le marché en 2000 (Foran 2012). Malheureusement, malgré les bénéfices importants au niveau du taux de réponse et de la survie, des toxicités hépatiques et hématologiques ont été observées et en 2010 le Mylotarg® a été retiré du marché (Foran 2012). Néanmoins, des tests cliniques évaluant des posologies différentes sont en cours et donnent des résultats prometteurs (Castaing et al. 2012).

Dans les LAM, CD13 est exprimé sur les progéniteurs myéloïdes leucémiques dans le sang ($CD34^+CD38^+$) et sur les cellules souches leucémiques $CD34^+CD38^-$ dans la niche de la moelle osseuse. Le microenvironnement médullaire inclut des cellules endothéliales, des ostéoblastes, des fibroblastes, des adipocytes et des chondrocytes qui peuvent exprimer CD13. Ces cellules influencent la survie et la prolifération des cellules hématopoïétiques normales et leucémiques en sécrétant des matrices permettant des contacts intercellulaires et des sécrétions de facteurs de croissance. Il sera important de savoir si le fait de bloquer CD13 par l'approche des anticorps monoclonaux entraîne des effets délétères sur ces cellules du microenvironnement de la moelle.

Nos expériences *in vitro* sur des lignées épithéliales $CD13^+$ (HEK-293, HepG2) montrent que l'anticorps anti-CD13 MY7 n'exerce pas d'effet sur la prolifération et la survie de ces cellules, suggérant l'intérêt potentiel des anti-CD13 dans les LAM.

Comme pour les anti-CD33, l'administration des anti-CD13, au vu de leur caractère hydrophile, de leur grande taille et la faible pénétration tissulaire qui en découle, pourrait être faite par voie intraveineuse. Les concentrations d'anticorps thérapeutiques libres sont décrites comme environ 10 fois plus faibles dans une grande partie des tissus que celles présentes dans le plasma. Cependant, des concentrations plus élevées sont généralement observées dans la moelle osseuse et la rate.

La pharmacocinétique pourrait être étudiée afin d'adapter les doses en fonction de la toxicité pour éventuellement permettre de cibler les cellules souches leucémiques $CD34^+CD38^-CD13^+$.

Par ailleurs, on pourrait envisager pour l'optimisation des anti-CD13 de les coupler à d'autres molécules ou particules, pour être utilisés comme des vecteurs pour réaliser de la radiothérapie ou de la chimiothérapie ciblée. L'internalisation du complexe antigène-anticorps lors de la fixation de l'anticorps anti-CD13 sur CD13 permettrait la pénétration de la molécule cytotoxique et ainsi renforcer l'action de l'anticorps seul. L'agent cytotoxique couplé, la méthode de couplage et l'agent de liaison devront être déterminés pour l'optimisation de l'action du conjugué. Malgré les difficultés rencontrées pour la réalisation des immunoconjugués, cette classe d'agents thérapeutiques reste une voie prometteuse.

PARTIE NON DIFFUSABLE

En conclusion, le travail présenté dans ce manuscrit a permis de mettre en évidence les capacités d'anticorps monoclonaux anti-CD13 et d'une flavone originale à induire *in vitro* des voies d'apoptose déficientes dans les cellules de LAM. Les propriétés de ces agents pro-apoptotiques méritent d'être analysées de façon plus approfondie *in vivo* dans des modèles leucémiques murins. Malheureusement, il n'existe pas de modèles murins ayant toutes les caractéristiques des LAM. En effet, l'extrême complexité génétique de ces pathologies rend difficile le développement d'un tel modèle. La principale stratégie utilisée aujourd'hui pour étudier des molécules à visée thérapeutique pour le traitement des LAM chez les souris, consiste en une xénogreffe de cellules humaines primaires ou de lignées chez des souris

immunodéprimées. Mais cette stratégie donne des phénotypes incomplets de la pathologie et variables selon les échantillons utilisés.

La résistance spontanée ou l'acquisition de résistances lors des traitements des LAM nécessite le développement de stratégies combinatoires associant des molécules avec des modes d'action différents pour augmenter l'efficacité des traitements. Les immunoconjugués (anticorps couplés à une drogue) sont des anticorps très prometteurs. Dans cette perspective, on pourrait envisager des immunoconjugués anti-CD13 ou anti-CD33 couplés à notre flavone DD1... Pourquoi pas ?

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J et al., 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research*, 59(11), p.2615-2622.
- Adams, J M & Cory, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), p.1324-1337.
- Adams, Jerry M, 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development*, 17(20), p.2481-2495.
- Adrain, C., Murphy, B.M. & Martin, S.J., 2005. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), p.4663-4673.
- Al-Ali, H.K. et al., 2012. Azacitidine in patients with acute myeloid leukemia medically unfit for or resistant to chemotherapy: a multicenter phase I/II study. *Leukemia & lymphoma*, 53(1), p.110-117.
- Almond, J.B. & Cohen, G.M., 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 16(4), p.433-443.
- Altman, J.K., Sassano, A., Kaur, S., et al., 2011. Dual mTORC2/mTORC1 targeting results in potent suppressive effects on acute myeloid leukemia (AML) progenitors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), p.4378-4388.
- Altman, J.K., Sassano, A. & Platanias, L.C., 2011. Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget*, 2(6), p.510-517.
- An, W.G. et al., 2000. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 14(7), p.1276-1283.
- Anderson, K. et al., 2011. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, 469(7330), p.356-361.
- Anon, Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1980 à 2005.pdf.
- Anon, Hospices civils de Lyon / Institut de veille sanitaire / Institut national du cancer / Francim / Institut national de la santé et de la recherche médicale. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique. Juin 2011..pdf.
- Asensi, M. et al., 2011. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(5-6), p.197-216.
- Attar, E.C. et al., 2008. Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), p.1446-1454.

- Baer, M.R. et al., 2002. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood*, 100(4), p.1224-1232.
- Bagrintseva, K. et al., 2005. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood*, 105(9), p.3679-3685.
- Bailly, Christian, 2009. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, 77(9), p.1447-1457.
- Ball, E.D. & Broome, H.E., 2010. Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Best practice & research. Clinical haematology*, 23(3), p.403-416.
- Baltimore, D., 2011. NF- κ B is 25. *Nature immunology*, 12(8), p.683-685.
- Basañez, G. et al., 2001. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), p.31083-31091.
- Baud, V. & Karin, M., 2009. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(1), p.33-40.
- Baumgartner, B. et al., 2002. Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 16(10), p.2062-2071.
- Bauvois, B. et al., 2003. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Flavone-8-acetic Acid Derivatives as Reversible Inhibitors of Aminopeptidase N/CD13. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(18), p.3900-3913.
- Bauvois, B. & Dauzonne, D., 2006. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Medicinal Research Reviews*, 26(1), p.88-130.
- Befani, C.D. et al., 2012. Bortezomib represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 90(1), p.45-54.
- Belloc, F et al., 1997. Bcr-abl translocation can occur during the induction of multidrug resistance and confers apoptosis resistance on myeloid leukemic cell lines. *Cell death and differentiation*, 4(8), p.806-814.
- Belson, M., Kingsley, B. & Holmes, A., 2007. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), p.138-145.
- Bennett, J M et al., 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33(4), p.451-458.
- Bhagwat, S.V. et al., 2001. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*, 97(3), p.652-659.

- Billen, L.P., Shamas-Din, A & Andrews, D W, 2008. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 27 Suppl 1, p.S93-104.
- Billottet, C. et al., 2006. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*, 25(50), p.6648-6659.
- Birkenkamp, K.U. et al., 2004. Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 18(1), p.103-112.
- Blum, W. et al., 2012. Clinical and pharmacodynamic activity of bortezomib and decitabine in acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(25), p.6025-6031.
- Boissel, Nicolas et al., 2010. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(23), p.3717-3723.
- Bonnet, D. & Dick, J E, 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), p.730-737.
- Bortul, R et al., 2003. Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 17(2), p.379-389.
- Bowen, D.T., 2006. Etiology of acute myeloid leukemia in the elderly. *Seminars in Hematology*, 43(2), p.82-88.
- Brandts, C.H. et al., 2005. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer research*, 65(21), p.9643-9650.
- Brandwein, J M et al., 2011. A phase I/II study of imatinib plus reinduction therapy for c-kit-positive relapsed/refractory acute myeloid leukemia: inhibition of Akt activation correlates with complete response. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 25(6), p.945-952.
- Breccia, M. & Alimena, G., 2010. NF-κB as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Expert opinion on therapeutic targets*, 14(11), p.1157-1176.
- Breccia, M. & Lo-Coco, F., 2011. Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute promyelocytic leukemia: mechanisms of action and resistance, safety and efficacy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(2), p.225-234.
- Bueso-Ramos, C.E. et al., 2004. Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia. *Human pathology*, 35(2), p.246-253.

- Burnett, A., Wetzler, M. & Löwenberg, Bob, 2011. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), p.487-494.
- Burnett, A.K. et al., 2009. The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial. *British journal of haematology*, 145(3), p.318-332.
- Buss, E.C. & Ho, A.D., 2011. Leukemia stem cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 129(10), p.2328-2336.
- Callera, F. et al., 2008. Lack of antileukemic activity of rapamycin in elderly patients with acute myeloid leukemia evolving from a myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*, 32(10), p.1633-1634.
- Carroll, M., 2009. Taking aim at protein translation in AML. *Blood*, 114(8), p.1458 -1459.
- Cartron, G. & Rossi, J.-F., 2009. [Therapeutic monoclonal antibodies in onco-hematology]. *Médecine sciences: M/S*, 25(12), p.1085-1089.
- Castaigne, S. et al., 2012. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 379(9825), p.1508-1516.
- Castanier, C. & Arnoult, D., 2010. [Mitochondrial dynamics during apoptosis]. *Médecine Sciences: M/S*, 26(10), p.830-835.
- Chamuleau, M.E.D. et al., 2011. High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2. *Leukemia research*, 35(6), p.741-749.
- Chanan-Khan, A., 2004. Bcl-2 antisense therapy in hematologic malignancies. *Current opinion in oncology*, 16(6), p.581-585.
- Changlong, L. et al., 2008. 6-O-Angeloylenolin induces apoptosis through a mitochondrial/caspase and NF-kappaB pathway in human leukemia HL60 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 62(6), p.401-409.
- Chao, Y. et al., 2005. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS biology*, 3(6), p.e183.
- Chapuis, Nicolas et al., 2010. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica*, 95(3), p.415-423.
- Chen, D. et al., 2011. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current cancer drug targets*, 11(3), p.239-253.
- Cheng, S. et al., 2010. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(23), p.5679-5691.

- Chonghaile, T.N. & Letai, A, 2008. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene*, 27 Suppl 1, p.S149-157.
- Chou, W.-C. et al., 2010. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*, 116(20), p.4086-4094.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. & Bhat, G.K., 2008. Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 151(1), p.10-27.
- Cilloni, D. et al., 2007. Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *Haematologica*, 92(9), p.1224-1229.
- Clinicaltrials.gov, NCT 00542971-Results. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00542971?term=NCT00542971&rank=1§=X0125>.
- ClinicalTrials.gov, 2012. *Study of EB10 in patients with leukemia*. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00887926>.
- Colado, E. et al., 2008. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*, 93(1), p.57-66.
- Colmone, A. et al., 2008. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), p.1861-1865.
- Colombo, E, Alcalay, M & Pelicci, P.G., 2011. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*, 30(23), p.2595-2609.
- Conticello, C. et al., 2008. Antitumor activity of bortezomib alone and in combination with TRAIL in human acute myeloid leukemia. *Acta haematologica*, 120(1), p.19-30.
- Conus, S. et al., 2008. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(3), p.685-698.
- Cools, J. et al., 2004. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer research*, 64(18), p.6385-6389.
- Corey, S.J. et al., 2007. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature Reviews. Cancer*, 7(2), p.118-129.
- Cornillet-Lefebvre, P et al., 2006. Constitutive phosphoinositide 3-kinase activation in acute myeloid leukemia is not due to p110delta mutations. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 20(2), p.374-376.

- Corral, J. et al., 1996. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*, 85(6), p.853-861.
- Cortes, J. et al., 2004. Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(10), p.3371-3376.
- Cortes, J. et al., 2003. Results of imatinib mesylate therapy in patients with refractory or recurrent acute myeloid leukemia, high-risk myelodysplastic syndrome, and myeloproliferative disorders. *Cancer*, 97(11), p.2760-2766.
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B. & Engelman, J.A., 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(6), p.1075-1083.
- Crawford, L.J., Walker, B. & Irvine, A.E., 2011. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of cell communication and signaling*, 5(2), p.101-110.
- Cripe, L.D. et al., 2010. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood*, 116(20), p.4077-4085.
- Cristóbal, I. et al., 2011. PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 25(4), p.606-614.
- Daenen, S. et al., 2004. Addition of cyclosporin A to the combination of mitoxantrone and etoposide to overcome resistance to chemotherapy in refractory or relapsing acute myeloid leukaemia: a randomised phase II trial from HOVON, the Dutch-Belgian Haemato-Oncology Working Group for adults. *Leukemia research*, 28(10), p.1057-1067.
- Dai, Y. et al., 2011. Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells in association with perturbations in NF- κ B and Bim. *British journal of haematology*, 153(2), p.222-235.
- Danial, N.N., 2008. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene*, 27, p.S53-S70.
- Dash, A. & Gilliland, D G, 2001. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 14(1), p.49-64.
- Datta, S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development*, 13(22), p.2905-2927.
- Daver, N. & Cortes, J., 2012. Molecular targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 17 Suppl 1, p.S59-62.
- Delhommeau, F. et al., 2009. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, 360(22), p.2289-2301.

- Deschler, B. & Lübbert, M., 2006. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9), p.2099-2107.
- Dhar, R. et al., 2009. Proteolytic cleavage of p70 ribosomal S6 kinase by caspase-3 during DNA damage-induced apoptosis. *Biochemistry*, 48(7), p.1474-1480.
- Ding, Lan et al., 2009. Anti-proliferation, cell cycle arrest and apoptosis induced by a natural xanthone from *Gentianopsis paludosa* Ma, in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 23(3), p.408-417.
- Doepfner, K.T., Spertini, O. & Arcaro, A., 2007. Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(9), p.1921-1930.
- Döhner, H. et al., 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), p.453-474.
- Döhner, H. & Gaidzik, V.I., 2011. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2011, p.36-42.
- Döhner, K. & Döhner, H., 2008. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 93(7), p.976-982.
- Dolcet, X. et al., 2006. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), p.22118-22130.
- Dorrello, N.V. et al., 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5798), p.467-471.
- Drexler, H.C., 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3), p.855-860.
- Du, H. et al., 2011. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *The Journal of biological chemistry*, 286(1), p.491-501.
- Engelman, J.A., Luo, Ji & Cantley, L.C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics*, 7(8), p.606-619.
- Erba, H.P., 2010. Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia? *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 23(4), p.495-501.
- Estey, Elihu & Döhner, H., 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368(9550), p.1894-1907.

- Estrov, Zeev et al., 2003. Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 102(3), p.987-995.
- Van Etten, R.A., 2007. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene*, 26(47), p.6738-6749.
- Faderl, S. et al., 2009. Kit inhibitor APcK110 induces apoptosis and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer research*, 69(9), p.3910-3917.
- Falini, B. et al., 2011. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*, 117(4), p.1109-1120.
- Falini, B. et al., 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England Journal of Medicine*, 352(3), p.254-266.
- Fandy, T.E. et al., 2009. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*, 114(13), p.2764-2773.
- Fang, H.-T. et al., 2012. Bortezomib interferes with C-KIT processing and transforms the t(8;21)-generated fusion proteins into tumor-suppressing fragments in leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), p.2521-2526.
- Fathi, A.T., Grant, S. & Karp, Judith E, 2010. Exploiting cellular pathways to develop new treatment strategies for AML. *Cancer treatment reviews*, 36(2), p.142-150.
- Feldman, E.J. et al., 2005. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(18), p.4110-4116.
- Fennell, D.A., Chacko, A. & Mutti, L., 2008. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*, 27(9), p.1189-1197.
- Fenton, T.R. & Gout, I.T., 2011. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(1), p.47-59.
- Ferrara, F., 2012. New agents for acute myeloid leukemia: is it time for targeted therapies? *Expert opinion on investigational drugs*, 21(2), p.179-189.
- Fischer, U., Jänicke, R.U. & Schulze-Osthoff, K., 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation*, 10(1), p.76-100.
- Foran, J.M., 2012. Targeted therapy of acute myeloid leukemia in 2012: towards individualized therapy. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 17 Suppl 1, p.S137-140.

- Ford, A.M. et al., 1998. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), p.4584-4588.
- Frank, S. et al., 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental cell*, 1(4), p.515-525.
- Frankland-Searby, S. & Bhaumik, S.R., 2012. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1825(1), p.64-76.
- Frelin, C. et al., 2005. Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 105(2), p.804-811.
- Fröhling, S. et al., 2005. Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*, 23(26), p.6285-6295.
- Fuchs, O. et al., 2009. Antiproliferative and proapoptotic effects of proteasome inhibitors and their combination with histone deacetylase inhibitors on leukemia cells. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 9(1), p.62-77.
- Fukasawa, K. et al., 2006. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer letters*, 243(1), p.135-143.
- Fukuda, S., Mantel, C.R. & Pelus, L.M., 2004. Survivin regulates hematopoietic progenitor cell proliferation through p21WAF1/Cip1-dependent and -independent pathways. *Blood*, 103(1), p.120-127.
- Furukawa, Yutaka et al., 2005. Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia. *Molecular cancer research: MCR*, 3(6), p.325-334.
- Gallay, N et al., 2009. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 23(6), p.1029-1038.
- Galluzzi, L. et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), p.107-120.
- Garcia-Manero, Guillermo et al., 2008. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(3), p.1060-1066.
- Garcia-Manero, Guillermo et al., 2006. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*, 108(10), p.3271-3279.
- Gerrard, G. et al., 2004. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica*, 89(7), p.782-790.

- Giles, F. et al., 2006. A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(15), p.4628-4635.
- Gilliland, D Gary & Griffin, J.D., 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), p.1532-1542.
- Gilliland, D Gary, Jordan, Craig T & Felix, C.A., 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, p.80-97.
- Godley, L.A. & Larson, R.A., 2008. Therapy-related myeloid leukemia. *Seminars in Oncology*, 35(4), p.418-429.
- Gojo, Ivana et al., 2007. Phase 1 and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias. *Blood*, 109(7), p.2781-2790.
- Goldschneider, D. & Mehlen, P., 2010. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*, 29(13), p.1865-1882.
- Goyama, S. & Mulloy, J.C., 2011. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects. *International Journal of Hematology*, 94(2), p.126-133.
- Greaves, Mel & Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), p.306-313.
- Grosjean-Raillard, J et al., 2009. ATM mediates constitutive NF-kappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 28(8), p.1099-1109.
- Grosjean-Raillard, Jennifer et al., 2008. Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 13(9), p.1148-1161.
- Guzman, M L et al., 2001. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, 98(8), p.2301-2307.
- Haag, P. et al., 2009. Deficient activation of Bak and Bax confers resistance to gemtuzumab ozogamicin-induced apoptotic cell death in AML. *Experimental hematology*, 37(6), p.755-766.
- Han, D.H. & Kim, J.H., 2009. Difference in growth suppression and apoptosis induction of EGCG and EGC on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 32(4), p.543-547.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), p.57-70.

- Harousseau, J.-L. et al., 2007. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*, 109(12), p.5151-5156.
- Harousseau, J.-L. et al., 2009. A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood*, 114(6), p.1166-1173.
- Hashida, H. et al., 2002. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*, 122(2), p.376-386.
- He, L.Z. et al., 1997. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), p.5302-5307.
- Heidel, F. et al., 2006. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*, 107(1), p.293-300.
- Hennessy, B.T. et al., 2005. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(12), p.988-1004.
- Hideshima, T. et al., 2009. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114(5), p.1046-1052.
- van der Holt, B. et al., 2005. The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood*, 106(8), p.2646-2654.
- Hostanska, K. et al., 2002. Aqueous ethanolic extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells in vitro. *Die Pharmazie*, 57(5), p.323-331.
- Hou, D.-X. & Kumamoto, T., 2010. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), p.691-719.
- Huang, S.-T. et al., 2010. Wogonin, an active compound in *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis and reduces telomerase activity in the HL-60 leukemia cells. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 17(1), p.47-54.
- Huang, W.-C. et al., 2009. Glycogen synthase kinase-3beta mediates endoplasmic reticulum stress-induced lysosomal apoptosis in leukemia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 329(2), p.524-531.
- Hutter, G. et al., 2012. Proteasome inhibition leads to dephosphorylation and downregulation of protein expression of members of the Akt/mTOR pathway in MCL. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552006> [Consulté mai 28, 2012].

- Ikezoe, T. et al., 2011. Expression of p-JAK2 predicts clinical outcome and is a potential molecular target of acute myelogenous leukemia. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 129(10), p.2512-2521.
- Jahani-Asl, A., Basak, A. & Tsang, B.K., 2007. Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation. *FEBS Letters*, 581(16), p.2883-2888.
- Jaiswal, S. et al., 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 138(2), p.271-285.
- Jin, L. et al., 2009. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell stem cell*, 5(1), p.31-42.
- Jin, L. et al., 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature medicine*, 12(10), p.1167-1174.
- Jin, U.-H. et al., 2008. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 310(1-2), p.43-48.
- Jost, Philipp J et al., 2009. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 460(7258), p.1035-1039.
- Julien, L.-A. et al., 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Molecular and cellular biology*, 30(4), p.908-921.
- Juliussan, G. et al., 2009. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113(18), p.4179-4187.
- Kadia, T.M. et al., 2010. A phase I study of vorinostat in combination with idarubicin in relapsed or refractory leukaemia. *British journal of haematology*, 150(1), p.72-82.
- Kamimura, T. et al., 2011. Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer science*, 102(11), p.1929-1937.
- Kane, E.V. et al., 1999. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *British Journal of Cancer*, 81(7), p.1228-1233.
- Kang, M.H. & Reynolds, C.P., 2009. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), p.1126-1132.
- Kantari, C. & Walczak, H., 2011. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), p.558-563.
- Kantarjian, H. et al., 2007. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 109(1), p.52-57.

- Karp, J E et al., 2001. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, 97(11), p.3361-3369.
- Karp, Judith E et al., 2009. Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a preclinical and phase 1 trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. *Blood*, 113(20), p.4841-4852.
- Karp, Judith E et al., 2012. Multi-institutional phase 2 clinical and pharmacogenomic trial of tipifarnib plus etoposide for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*, 119(1), p.55-63.
- Karp, Judith E et al., 2005. Phase I and pharmacokinetic study of flavopiridol followed by 1-beta-D-arabinofuranosylecytosine and mitoxantrone in relapsed and refractory adult acute leukemias. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(23), p.8403-8412.
- Karp, Judith E et al., 2007. Sequential flavopiridol, cytosine arabinoside, and mitoxantrone: a phase II trial in adults with poor-risk acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), p.4467-4473.
- Karp, Judith E. et al., 2003. Timed Sequential Therapy of Acute Leukemia with Flavopiridol In Vitro Model for a Phase I Clinical Trial. *Clinical Cancer Research*, 9(1), p.307-315.
- Kaufmann, T, Strasser, A & Jost, P J, 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation*, 19(1), p.42-50.
- Kelly, L.M. & Gilliland, D Gary, 2002. Genetics of myeloid leukemias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3, p.179-198.
- Khan, I, Malinge, S. & Crispino, J., 2011. Myeloid leukemia in Down syndrome. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 16(1-2), p.25-36.
- Kim, Y.R. et al., 2010. Myeloperoxidase expression as a potential determinant of parthenolide-induced apoptosis in leukemia bulk and leukemia stem cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335(2), p.389-400.
- Kirsch, D.G. et al., 1999. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *The Journal of biological chemistry*, 274(30), p.21155-21161.
- Kitazumi, I. & Tsukahara, M., 2011. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *The FEBS Journal*, 278(3), p.427-441.
- Klampfer, L. et al., 1996. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), p.14059-14064.
- Klasa, R.J. et al., 2002. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense & nucleic acid drug development*, 12(3), p.193-213.

- Knapper, S. et al., 2006. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*, 108(10), p.3262-3270.
- Knapper, S., 2011. The clinical development of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(10), p.1377-1395.
- Kolitz, J.E. et al., 2010. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood*, 116(9), p.1413-1421.
- Konopleva, M et al., 2012. MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 26(4), p.778-787.
- Konopleva, M.Y. & Jordan, Craig T, 2011. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), p.591-599.
- Konopleva, Marina et al., 2008. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer research*, 68(9), p.3413-3420.
- Konopleva, Marina et al., 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*, 10(5), p.375-388.
- Krivtsov, A.V. & Armstrong, S.A., 2007. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Reviews. Cancer*, 7(11), p.823-833.
- Kuendgen, A. et al., 2004. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood*, 104(5), p.1266-1269.
- Labi, V. et al., 2008. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell death and differentiation*, 15(6), p.977-987.
- Lafont, E. et al., 2010. Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. *PloS one*, 5(10), p.e13638.
- Lancet, Jeffrey E et al., 2007. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109(4), p.1387-1394.
- Lancet, Jeffrey E et al., 2011. A phase I clinical-pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in advanced acute leukemias. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(5), p.1140-1146.
- Landes, T. & Martinou, J.-C., 2011. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), p.540-545.

- Lansiaux, A. & Bailly, C, 2000. [Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor]. *Bulletin du cancer*, 87(10), p.697-701.
- Laubach, J. & Rao, A.V., 2008. Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *The Oncologist*, 13(10), p.1097-1108.
- Laussmann, M A et al., 2011. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell death and differentiation*, 18(10), p.1584-1597.
- Lavrik, I.N. & Krammer, P.H., 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and differentiation*, 19(1), p.36-41.
- Leber, B, Lin, J. & Andrews, D W, 2010. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639903> [Consulté septembre 23, 2010].
- Lee, J.W. et al., 2006. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene*, 25(9), p.1434-1436.
- Lee, Y.K. et al., 2006. Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions, attenuates STAT3-directed transcription, and combines with the Jak kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy. *Molecular cancer therapeutics*, 5(1), p.138-148.
- Legrand, O et al., 1999. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 94(3), p.1046-1056.
- Leone, G. et al., 2008. Epigenetic treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Current medicinal chemistry*, 15(13), p.1274-1287.
- Letai, Anthony et al., 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*, 2(3), p.183-192.
- Levis, M. et al., 2004. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*, 104(4), p.1145-1150.
- Ley, T.J. et al., 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 363(25), p.2424-2433.
- Leymarie, V. et al., 2004. [Diagnosis of myeloid hematologic malignancies: contributions of the 2001 World Health Organization (WHO) classification]. *Annales De Biologie Clinique*, 62(5), p.513-520.
- Li, B. & Dou, Q.P., 2000. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), p.3850-3855.
- Li, C. et al., 2008. Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 7(6), p.1647-1655.

- Li, G. et al., 2011. GADD45 α and annexin A1 are involved in the apoptosis of HL-60 induced by resveratrol. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(8-9), p.704-709.
- Li, J & Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), p.6194-6206.
- Li, X. et al., 2010. Effect of noncompetitive proteasome inhibition on bortezomib resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(14), p.1069-1082.
- Licht, J D, 2001. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 20(40), p.5660-5679.
- List, A.F. et al., 2001. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, 98(12), p.3212-3220.
- Liu, C.-X. et al., 2012. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. *Nature chemical biology*, 8(5), p.486-493.
- Liu, S. et al., 2008. Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF- κ B-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(4), p.2364-2373.
- Liu, T., Brouha, B. & Grossman, D., 2004. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*, 23(1), p.39-48.
- Llambi, F. et al., 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell*, 44(4), p.517-531.
- Llambi, F. & Green, Douglas R, 2011. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(1), p.12-20.
- Löwenberg, B et al., 1989. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 7(9), p.1268-1274.
- Lübbert, M. et al., 2012. A multicenter phase II trial of decitabine as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia judged unfit for induction chemotherapy. *Haematologica*, 97(3), p.393-401.
- Lujambio, A. & Lowe, S.W., 2012. The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), p.347-355.
- Lunghi, P. et al., 2003. Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 17(9), p.1783-1793.

- Luo, Ji, Manning, B.D. & Cantley, L.C., 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer cell*, 4(4), p.257-262.
- Ma, X.M. & Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(5), p.307-318.
- Maas, C. et al., 2010. Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death and Differentiation*, 17(10), p.1613-1623.
- MacLaren, A.P. et al., 2001. p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell death and differentiation*, 8(3), p.210-218.
- Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D.C., 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical Journal*, 441(1), p.1-21.
- Majeti, R., 2011. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*, 30(9), p.1009-1019.
- Majeti, Ravindra, Chao, M.P., et al., 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 138(2), p.286-299.
- Majeti, Ravindra, Becker, M.W., et al., 2009. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), p.3396-3401.
- Marcucci, G. et al., 2003. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, 101(2), p.425-432.
- Marcucci, G. et al., 2005. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(15), p.3404-3411.
- Marcucci, G., Haferlach, Torsten & Döhner, H., 2011. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), p.475-486.
- Mardis, E.R. et al., 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine*, 361(11), p.1058-1066.
- Marfe, G. et al., 2009. Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *Journal of cellular biochemistry*, 106(4), p.643-650.
- Marschalek, R., 2010. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *The FEBS Journal*, 277(8), p.1822-1831.

- Martelli, A M et al., 2011. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 25(7), p.1064-1079.
- Martelli, Alberto M et al., 2009. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(9), p.1333-1349.
- Martelli, Alberto M et al., 2010. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*, 1(2), p.89-103.
- Martens, J.H.A. & Stunnenberg, H.G., 2010. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Letters*, 584(12), p.2662-2669.
- Martinez-Caballero, S. et al., 2009. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), p.12235-12245.
- Mathieu, J. et al., 2005. Retinoid-induced activation of NF-kappaB in APL cells is not essential for granulocytic differentiation, but prolongs the life span of mature cells. *Oncogene*, 24(48), p.7145-7155.
- Matondo, M. et al., 2010. Proteasome inhibitor-induced apoptosis in acute myeloid leukemia: a correlation with the proteasome status. *Leukemia research*, 34(4), p.498-506.
- Maurillo, L. et al., 2012. Azacitidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia: report of 82 patients enrolled in an Italian Compassionate Program. *Cancer*, 118(4), p.1014-1022.
- Mayo, L.D. & Donner, D.B., 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), p.11598-11603.
- McConkey, D.J. & Zhu, K., 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 11(4-5), p.164-179.
- McHale, C.M., Zhang, Luoping & Smith, M.T., 2012. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis*, 33(2), p.240-252.
- Mebratu, Y. & Tesfagzi, Y., 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(8), p.1168-1175.
- Meek, M.E.B. & Klaunig, J.E., 2010. Proposed mode of action of benzene-induced leukemia: Interpreting available data and identifying critical data gaps for risk assessment. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1-2), p.279-285.
- Ménoret, E. et al., 2010. Mcl-1(128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS letters*, 584(3), p.487-492.

- Merhi, F. et al., 2008. Allium compounds, dipropyl and dimethyl thiosulfinates as antiproliferative and differentiating agents of human acute myeloid leukemia cell lines. *Biologics: targets & therapy*, 2(4), p.885-895.
- Mi, S. et al., 2007. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), p.19971-19976.
- Milella, M. et al., 2001. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), p.851-859.
- Miller, C.P. et al., 2007. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells. *Blood*, 110(1), p.267-277.
- Mina-Osorio, P. & Ortega, E., 2005. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *Journal of leukocyte biology*, 77(6), p.1008-1017.
- Misaghian, N. et al., 2009. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 23(1), p.25-42.
- Miyamoto, S., 2011. Nuclear initiated NF-κB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell research*, 21(1), p.116-130.
- Möhle, R. et al., 2000. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 110(3), p.563-572.
- Monneret, C., 2010. [Current impact of natural products in the discovery of anticancer drugs]. *Annales pharmaceutiques françaises*, 68(4), p.218-232.
- Mrózek, K. et al., 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), p.431-448.
- Mrózek, K. et al., 2009. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 16(2), p.64-69.
- Mrózek, K. & Bloomfield, C.D., 2006. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, p.169-177.
- Murray, M.Y., Rushworth, S.A. & MacEwan, D.J., 2012. Micro RNAs as a new therapeutic target towards leukaemia signalling. *Cellular Signalling*, 24(2), p.363-368.
- Nakagawa, T. et al., 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033), p.652-658.

- Nakanishi, M. et al., 1999. Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors. *Journal of Radiation Research*, 40(2), p.159-167.
- Neame, P.B. et al., 1986. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*, 68(6), p.1355-1362.
- Nelson, D.M. et al., 2011. Flavopiridol induces BCL-2 expression and represses oncogenic transcription factors in leukemic blasts from adults with refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 52(10), p.1999-2006.
- Ning, Z.Q., Li, J & Arceci, R.J., 2001. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*, 97(11), p.3559-3567.
- Obeng, E.A., 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12), p.4907-4916.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature immunology*, 12(8), p.695-708.
- Oerlemans, R. et al., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112(6), p.2489-2499.
- Ogilvy, S. et al., 1999. Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), p.14943-14948.
- Oh, J.H. et al., 2008. Induction of apoptosis by withaferin A in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 13(12), p.1494-1504.
- Oh, J.H. et al., 2009. The coffee diterpene kahweol induces apoptosis in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation and activation of JNK. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(11), p.1378-1386.
- Orlowski, R.Z. et al., 2005. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*, 105(8), p.3058-3065.
- Owen, C., Fitzgibbon, J. & Paschka, P., 2010. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematological Oncology*, 28(1), p.13-19.
- Pabst, T. et al., 2001. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*, 27(3), p.263-270.
- Papa, V et al., 2008. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(1), p.147-160.

- Park, C. et al., 2008. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells through activation of JNK and ERK. *Toxicology and applied pharmacology*, 227(2), p.219-228.
- Park, J.H. et al., 2008. Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(12), p.3684-3690.
- Park, S.R. et al., 2010. Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. *The Journal of antibiotics*, 63(8), p.434-441.
- Park, Sophie et al., 2009. Role of the PI3K/AKT and mTOR signalling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951971> [Consulté avril 22, 2010].
- Paschka, P. et al., 2010. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(22), p.3636-3643.
- Pasqualini, R et al., 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer research*, 60(3), p.722-727.
- Pécuchet, N. et al., 2010. [Histone deacetylase inhibitors: highlight on epigenetic regulation]. *Bulletin du cancer*, 97(8), p.917-935.
- Pemmaraju, N. et al., 2011. FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era? *Cancer*, 117(15), p.3293-3304.
- Pérez-Galán, P. et al., 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107(1), p.257-264.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T. & Fesik, S.W., 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1644(2-3), p.83-94.
- Pierce, D.A. et al., 1996. Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part I. Cancer: 1950-1990. *Radiation Research*, 146(1), p.1-27.
- Pigneux, A. et al., 2007. Proteasome inhibition specifically sensitizes leukemic cells to anthracyclin-induced apoptosis through the accumulation of Bim and Bax pro-apoptotic proteins. *Cancer biology & therapy*, 6(4), p.603-611.
- Piloto, O. et al., 2006. IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. *Cancer research*, 66(9), p.4843-4851.
- Piloto, O. et al., 2007. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood*, 109(4), p.1643-1652.

- Del Poeta, G. et al., 2003. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 101(6), p.2125-2131.
- Pratz, K.W. et al., 2010. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*, 115(7), p.1425-1432.
- Prebet, T. & Vey, N., 2011. Vorinostat in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(2), p.287-295.
- Qian, Z. et al., 2010. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1–2), p.50-57.
- Quiney, C. et al., 2004. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leukemia Research*, 28(8), p.851-861.
- Quintás-Cardama, A., Santos, F.P.S. & Garcia-Manero, G., 2011. Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 25(2), p.226-235.
- Raffoux, E. et al., 2010. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*, 1(1), p.34-42.
- Rahmani, M. et al., 2005. Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Research*, 65(6), p.2422-2432.
- Rahmani, M. et al., 2012. Inhibition of Bcl-2 antiapoptotic members by obatoclax potently enhances sorafenib-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a Bim-dependent process. *Blood*, 119(25), p.6089-6098.
- Di Raimondo, F. & Conticello, C., 2010. Captivating bortezomib: an active but still mysterious drug. *Leukemia research*, 34(4), p.411-412.
- Rangel, R. et al., 2007. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), p.4588-4593.
- Rao, A.V. et al., 2009. Age-specific differences in oncogenic pathway dysregulation and anthracycline sensitivity in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(33), p.5580-5586.
- Raza, A. et al., 2009. Complete remissions observed in acute myeloid leukemia following prolonged exposure to lintuzumab: a phase 1 trial. *Leukemia & lymphoma*, 50(8), p.1336-1344.
- Récher, Christian et al., 2005. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*, 105(6), p.2527-2534.

- Reckzeh, K. & Cammenga, J., 2010. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, 91(4), p.557-568.
- Renneville, A et al., 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(5), p.915-931.
- Reya, T et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), p.105-111.
- Reya, Tannishtha et al., 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6938), p.409-414.
- Riccioni, R. et al., 2005. TRAIL Decoy Receptors Mediate Resistance of Acute Myeloid Leukemia Cells to TRAIL. *Haematologica*, 90(5), p.612-624.
- Riccioni, Roberta et al., 2007. M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. *British journal of haematology*, 139(2), p.194-205.
- Riemann, D, Kehlen, A. & Langner, J., 1999. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunology today*, 20(2), p.83-88.
- Riemann, Dagmar et al., 2005. Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), p.1408-1412.
- Rizzieri, David A et al., 2008. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(9), p.2756-2762.
- Ruschak, A.M. et al., 2011. Novel Proteasome Inhibitors to Overcome Bortezomib Resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(13), p.1007-1017.
- Ruvinsky, I. et al., 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, 19(18), p.2199-2211.
- Saito, Yoriko et al., 2010. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Science Translational Medicine*, 2(17), p.17ra9.
- Sandler, A. et al., 2004. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(10), p.3265-3272.
- Santarpia, L., Lippman, S.M. & El-Naggar, A.K., 2012. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1), p.103-119.

- Sarbassov, D.D. et al., 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*, 22(2), p.159-168.
- Sargin, B. et al., 2007. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*, 110(3), p.1004-1012.
- Sato, T. et al., 2011. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood*, 117(12), p.3286-3293.
- Scappini, B. et al., 2001. Effects of signal transduction inhibitor 571 in acute myelogenous leukemia cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(12), p.3884-3893.
- Schaefer, E.W. et al., 2009. A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 94(10), p.1375-1382.
- Schimmer, Aaron D et al., 2008. A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(24), p.8295-8301.
- Schimmer, Aaron D et al., 2009. Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(28), p.4741-4746.
- Schlesinger, P.H. et al., 1997. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), p.11357-11362.
- Schmelzle, T. & Hall, M.N., 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2), p.253-262.
- Schnittger, S. et al., 2007. JAK2 seems to be a typical cooperating mutation in therapy-related t(8;21)/ AML1-ETO-positive AML. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(1), p.183-184.
- Scholl, S. et al., 2009. Clinical implications of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(4), p.491-505.
- Schoofs, T. & Müller-Tidow, C., 2011. DNA methylation as a pathogenic event and as a therapeutic target in AML. *Cancer treatment reviews*, 37 Suppl 1, p.S13-18.
- Schütze, S., Tchikov, V. & Schneider-Brachert, W., 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), p.655-662.
- Scott, F.L. et al., 2009. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*, 457(7232), p.1019-1022.

- Sekine, K, Fujii, H & Abe, F., 1999. Induction of apoptosis by bestatin (ubenimex) in human leukemic cell lines. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 13(5), p.729-734.
- Shamas-Din, Aisha et al., 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), p.508-520.
- Shapiro, G.I., 2006. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(11), p.1770-1783.
- Shima, H. et al., 1998. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *The EMBO journal*, 17(22), p.6649-6659.
- Shoji, K. et al., 2011. Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF- κ B in HL-60 cells. *Archives of pharmacal research*, 34(3), p.469-475.
- Smith, C.C. et al., 2012. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 485(7397), p.260-263.
- Solary, E. et al., 2003. Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomized study in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Blood*, 102(4), p.1202-1210.
- Soriano, A.O. et al., 2007. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 110(7), p.2302-2308.
- Steelman, L.S. et al., 2011. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 25(7), p.1080-1094.
- Steensma, D.P. et al., 2006. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 20(6), p.971-978.
- Stennicke, H.R. et al., 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *The Journal of biological chemistry*, 274(13), p.8359-8362.
- Sujobert, P. et al., 2005. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(3), p.1063-1066.
- Sutherland, M.K. et al., 2009. Anti-leukemic activity of lintuzumab (SGN-33) in preclinical models of acute myeloid leukemia. *mAbs*, 1(5), p.481-490.
- Tait, Stephen W G & Green, Douglas R, 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), p.621-632.

- Takahashi, S., 2011a. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 4, p.36.
- Takahashi, S., 2011b. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*, 4, p.13.
- Takahashi, S. et al., 2005. Over-expression of Flt3 induces NF-kappaB pathway and increases the expression of IL-6. *Leukemia research*, 29(8), p.893-899.
- Takebe, N. et al., 2011. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(2), p.97-106.
- Tamburini, Jerome et al., 2007. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood*, 110(3), p.1025-1028.
- Tamburini, Jerome et al., 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*, 111(1), p.379-382.
- Tamburini, Jerome, Green, Alexa S, Bardet, Valerie, et al., 2009. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*, 114(8), p.1618-1627.
- Tamburini, Jerome, Green, Alexa S, Chapuis, Nicolas, et al., 2009. Targeting translation in acute myeloid leukemia: a new paradigm for therapy? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(23), p.3893-3899.
- Tan, H. et al., 2008. Inhibition of ERK and activation of p38 are involved in diallyl disulfide induced apoptosis of leukemia HL-60 cells. *Archives of pharmacal research*, 31(6), p.786-793.
- Tang, R. et al., 2008. Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML). *BMC cancer*, 8, p.51.
- Tazzari, Pier Luigi et al., 2008. Synergistic proapoptotic activity of recombinant TRAIL plus the Akt inhibitor Perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer research*, 68(22), p.9394-9403.
- Testa, Ugo & Riccioni, Roberta, 2007. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(1), p.81-94.
- Thomas, X. & Elhamri, M., 2005a. [Farnesyltransferase inhibitors: preliminary results in acute myeloid leukemia]. *Bulletin Du Cancer*, 92(3), p.227-238.
- Thomas, X. & Elhamri, M., 2005b. [Farnesyltransferase inhibitors: preliminary results in acute myeloid leukemia]. *Bulletin du cancer*, 92(3), p.227-238.

- Topisirovic, I. et al., 2003. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Molecular and cellular biology*, 23(24), p.8992-9002.
- Tourneur, L. et al., 2004. Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome. *Cancer research*, 64(21), p.8101-8108.
- Towatari, M. et al., 1997. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 11(4), p.479-484.
- Treins, C. et al., 2010. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene*, 29(7), p.1003-1016.
- Vardiman, J.W. et al., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), p.937-951.
- Vardiman, J.W., 2010. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1-2), p.16-20.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L. & Brunning, R.D., 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), p.2292-2302.
- Veis, D.J. et al., 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75(2), p.229-240.
- Venditti, A. et al., 2004. Combined analysis of bcl-2 and MDR1 proteins in 256 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 89(8), p.934-939.
- Vivanco, I. & Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), p.489-501.
- Vu, C. & Fruman, D.A., 2010. Target of Rapamycin Signaling in Leukemia and Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 16(22), p.5374-5380.
- Walczak, H., 2011. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunological reviews*, 244(1), p.9-28.
- Wang, Liwei et al., 2010. The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nature structural & molecular biology*, 17(11), p.1324-1329.
- Wang, Z.-Y. & Chen, Z., 2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111(5), p.2505-2515.
- Wei, M.C. et al., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), p.727-730.

- Weisberg, E. et al., 2009. FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 12(3), p.81-89.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11), p.875-885.
- Westphal, D. et al., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), p.521-531.
- Willems, L et al., 2012. The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 26(6), p.1195-1202.
- Williams, S.A. & McConkey, D.J., 2003. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer research*, 63(21), p.7338-7344.
- Willis, S.N. et al., 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), p.856-859.
- Wilson, C.S. et al., 2006. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood*, 108(2), p.685-696.
- Winnicka, B. et al., 2010. CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *Journal of leukocyte biology*, 88(2), p.347-359.
- Wrześień-Kuś, A. et al., 2004. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 9(6), p.705-715.
- Wu, W.K.K. et al., 2010. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer letters*, 293(1), p.15-22.
- Wuchter, C. et al., 2001. In vitro susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of acute leukemia cells in the context of TRAIL receptor gene expression and constitutive NF-kappa B activity. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 15(6), p.921-928.
- Würstle, Maximilian L, Laussmann, Maike A & Rehm, Markus, 2012. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental cell research*, 318(11), p.1213-1220.
- Xavier, A.C., Ge, Y. & Taub, J.W., 2009. Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 11(5), p.371-380.
- Xu, K.-H. & Lu, D.-P., 2010. Plumbagin induces ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia cells in vivo. *Leukemia research*, 34(5), p.658-665.

- Xu, Q., Thompson, J.E. & Carroll, M., 2005. mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood*, 106(13), p.4261-4268.
- Yang, Y et al., 2000. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5467), p.874-877.
- Yazdanparast, R. & Meshkini, A., 2009. 3-Hydrogenkwadaphnine, a novel diterpene ester from *Dendrostellera lessertii*, its role in differentiation and apoptosis of KG1 cells. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16(2-3), p.206-214.
- Yee, K.W.H. et al., 2004. Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD-positive leukemic cells. *Blood*, 104(13), p.4202-4209.
- Yee, Karen W L et al., 2006. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(17), p.5165-5173.
- Yoon, J.S. et al., 2012. Anti-leukemic effect of 2-pyrone derivatives via MAPK and PI3 kinase pathways. *Investigational new drugs*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22526834> [Consulté juillet 27, 2012].
- Yoshinaga, S. et al., 2004. Cancer risks among radiologists and radiologic technologists: review of epidemiologic studies. *Radiology*, 233(2), p.313-321.
- Youle, Richard J & Strasser, Andreas, 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(1), p.47-59.
- Yousoufian, H. et al., 2010. Targeting FMS-related tyrosine kinase receptor 3 with the human immunoglobulin G1 monoclonal antibody IMC-EB10. *Cancer*, 116(4 Suppl), p.1013-1017.
- Yu, Chunrong et al., 2004. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Experimental cell research*, 295(2), p.555-566.
- Yuan, B.-Z., Chapman, J. & Reynolds, S.H., 2009. Proteasome inhibitors induce apoptosis in human lung cancer cells through a positive feedback mechanism and the subsequent Mcl-1 protein cleavage. *Oncogene*, 28(43), p.3775-3786.
- Zeng, Z. et al., 2009. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*, 113(24), p.6215-6224.
- Zhang, D.E. et al., 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), p.569-574.

- Zhang, K. et al., 2010. C/EBP β and CHOP participate in tanshinone IIA-induced differentiation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells in vitro. *International journal of hematology*, 92(4), p.571-578.
- Zhang, T. et al., 2011. Ursolic acid induces HL60 monocytic differentiation and upregulates C/EBP β expression by ERK pathway activation. *Anti-cancer drugs*, 22(2), p.158-165.
- Zhao, C. et al., 2009. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*, 458(7239), p.776-779.
- Zhao, C. et al., 2007. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 12(6), p.528-541.
- Zhen, T. et al., 2012. Targeting of AML1-ETO in t(8;21) Leukemia by Oridonin Generates a Tumor Suppressor–Like Protein. *Science Translational Medicine*, 4(127), p.127ra38-127ra38.
- Zhu, H. et al., 2005. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*, 24(31), p.4993-4999.